(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2002 年1 月24 日 (24.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/06483 A1

---

(51) 国際特許分類⁷: **C12N 15/12**, 1/21, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/68, A61K 38/00, 45/00, 48/00, A61P 1/00, 3/00, 9/00, 25/28, 29/00, 35/00, 37/00, G01N 33/15, 33/50, 33/50, 33/53, 33/566 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19)

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/06162

(22) 国際出願日: 2001 年7 月17 日 (17.07.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-217442 2000 年7 月18 日 (18.07.2000) JP
特願2001-026779 2001 年2 月2 日 (02.02.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大瀧徹也 (OHTAKI, Tetsuya) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ802号 Ibaraki (JP). 増田安司 (MASUDA, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0032 茨城県つくば市竹園1丁目8番地14 つくば・さくら団地906-210 Ibaraki (JP). 高津吉広 (TAKATSU, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒305-0032 茨城県つくば市竹園1丁目6番地2 つくば・さくら団地905-505 Ibaraki (JP). 渡辺卓也 (WATANABE, Takuya) [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka (JP). 寺尾寧子 (TERAO, Yasuko) [JP/JP]; 〒305-0034 茨城県つくば市大字小野崎985番地 ROYAL ZOA中山307号 Ibaraki (JP). 新谷 靖 (SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ703号 Ibaraki (JP). 日沼州司 (HINUMA, Syuji)

[続葉有]

---

(54) Title: NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規生理活性ペプチドおよびその用途

(57) Abstract: It is intended to provide a novel peptide and use thereof. More particularly speaking, a novel peptide; a DNA encoding the same; drugs containing the above peptide or DNA; a screening method/a screening kit for a compound or its salt promoting or inhibiting the activity of the above peptide; compounds or salts thereof obtained by the screening; drugs containing the compounds or salts thereof, etc. The above-described peptide and the DNA encoding the same are usable in, for example, diagnosing, treating and preventing digestive diseases, etc. Moreover, this peptide is useful as a reagent for screening a compound or its salt promoting or inhibiting the activity of the above peptide.

(57) 要約:

本発明は新規ペプチドおよびその用途の提供を目的とする。具体的には新規ペプチドおよびそれをコードするＤＮＡ、当該ペプチドもしくはＤＮＡを含有してなる医薬、当該ペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、当該スクリーニングによって得られる化合物またはその塩、当該化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

本発明のペプチドおよびそれをコードするＤＮＡは、例えば、消化器疾患などの診断、治療、予防などに使用することができる。また、本発明のペプチドは、本発明のタンパク質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

WO 02/06483 A1

BEST AVAILABLE COPY

[JP/JP]: 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1402号 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 小林純子, 外(KOBAYASHI, Sumiko et al.): 〒104-0028 東京都中央区八重洲2丁目8番7号 福岡ビル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規生理活性ペプチドおよびその用途

技術分野

本発明は、①配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチドまたはその塩、および②オーファン受容体タンパク質である配列番号：１または配列番号：で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と、配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、消化器疾患の予防·治療剤として有用な化合物またはその塩などのスクリーニング方法などに関する。

背景技術

生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節、感覚受容などの重要な機能調節は、様々なホルモンや神経伝達物質のような内在性因子あるいは光や匂いなどの感覚刺激をこれらに対して生体が備えている細胞膜に存在する特異的な受容体を介して細胞が受容し、それに応じた反応をすることによって行われている。このような機能調節に与るホルモンや神経伝達物質の受容体の多くは guanine nucleotide-binding protein（以下、Ｇタンパク質と略称する場合がある）と共役しており、このＧタンパク質の活性化によって細胞内にシグナルを伝達して様々な機能を発現させることを特徴とする。また、これらの受容体タンパク質は共通して７個の膜貫通領域を有する。これらのことからこうした受容体はＧタンパク質共役型受容体あるいは７回膜貫通型受容体と総称される。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質およびそれに対する受容体タンパク質が存在して相互作用し、重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質（ホルモンや神経伝達物質など）およびそれに対する受容体が存在するかどうかについてはいまだ不明なことが多い。

近年、ヒトゲノムＤＮＡあるいは各種ヒト組織由来のｃＤＮＡのランダムな配列決定による配列情報の蓄積および遺伝子解析技術の急速な進歩によってヒトの遺伝子が加速度的に解明されてきている。それにともない、機能未知のタンパク質をコードすると予想される多くの遺伝子の存在が明らかになっている。Ｇタンパク質共役型受容体は、７個の膜貫通領域を有するのみでなくその核酸あるいはアミノ酸に多くの共通配列が存在するためそのようなタンパク質の中から明確にＧタンパク質共役型受容体として区分することができる。一方でこうした構造の類似性を利用したポリメラーゼ・チェーン・リアクション（Polymerase Chain Reaction：以下、ＰＣＲと略称する）法によってもこうしたＧタンパク質共役型受容体遺伝子が得られている（Nature Cell Biology、Vol. 2、703-708 (2000)）。このようにしてこれまでに得られたＧタンパク質共役型受容体のうちには既知の受容体との構造の相同性が高いサブタイプであって容易にそのリガンドを予測することが可能な場合もあるが、ほとんどの場合その内因性リガンドは予測不能であり、これらの受容体は対応するリガンドが見いだされていない。このことからこれらの受容体はオーファン受容体と呼ばれている。このようなオーファン受容体の未同定の内因性リガンドは、リガンドが知られていなかったために十分な解析がなされていなかった生物現象に関与している可能性がある。そして、このようなリガンドが重要な生理作用や病態と関連している場合には、その受容体作動薬あるいは拮抗薬の開発が革新的な医薬品の創製に結びつくことが期待される（Stadel, J. et al.、TiPS、18巻、430-437頁、1997年、Marchese, A. et al.、TiPS、20巻、370-375頁、1999年、Civelli, O. et al.、Brain Res.、848巻、63-65頁、1999年）。しかし、これまで実際にオーファンＧタンパク質共役型受容体のリガンドを同定した例はそれほど多くない。

最近、幾つかのグループによってこうしたオーファン受容体のリガンド探索の試みがなされ、新たな生理活性ペプチドであるリガンドの単離・構造決定が報告されている。ReinsheidらおよびMeunierらは独立に、動物細胞にオーファンＧタンパク質共役型受容体ＬＣ１３２あるいはＯＲＬ１をコードするｃＤＮＡを導入して受容体を発現させ、その応答を指標としてorphanin FQあるいはnociceptinと名付けられた新規ペプチドをブタ脳あるいはラット脳の抽出物より単離し、配列を決定した（Reinsheid, R. K. et al.、Science、270巻、792-794頁、1995年、Meunier, J.-C. e t al.、Nature、377巻、532-535頁、1995年）。このペプチドは痛覚に関与していることが報告されたが、さらに、受容体のノックアウトマウスの研究により記憶に関与していることが明らかにされた（Manabe, T. et al.、Nature、394巻、577-581頁、1998年）。

その後これまでに上記と同様な方法によりＰｒＲＰ（prolactin releasing peptide）、ｏｒｅｘｉｎ、ａｐｅｌｉｎ、ｇｈｒｅｌｉｎおよびGALP（galanin-like peptide）などの新規ペプチドがオーファンＧタンパク質共役型受容体のリガンドとして単離された（Hinuma, S. et al.、Nature、393巻、272-276頁、1998年、Sakurai, T. et al.、Cell、92巻、573-585頁、1998年、Tatemoto, K. et al.、Bichem. Biophys. Res. Commun.、251巻、471-476頁、1998年、Kojima, M. et al.、Nature、402巻、656-660頁、1999年、Ohtaki, T. et al.、J. Biol. Chem.、274巻、37041-37045頁、1999年）。

一方、これまで明らかでなかった生理活性ペプチドの受容体が同様な方法によって解明される場合もある。腸管収縮に関与するｍｏｔｉｌｉｎの受容体がＧＰＲ３８であることが明らかにされた（Feighner, S. D. et al.、Science、284巻、2184-2188頁、1999年）ほか、ＳＬＣ－１がメラニン凝集ホルモン（ＭＣＨ）の受容体として同定され（Chambers, J. et al.、Nature、400巻、261-265頁、1999年、Saito, Y. et al.、Nature、400巻、265-269頁、1999年、Shimomura, Y. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、261巻、622-626頁、1999年、Lembo, P. M. C. et al.、Nature Cell Biol.、1巻、267-271頁、1999年、Bachner, D. et al.、FEBS Lett.、457巻、522-524頁、1999年）、またＧＰＲ１４（SENR）が urotensin II の受容体であることが報告された（Ames, R. S. et al.、Nature、401巻、282-286頁、1999年、Mori, M. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、265巻、123-129頁、1999年、Nothacker, H.-P. et al.、Nature Cell Biol.、1巻、383-385頁、1999年、Liu, Q. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、266巻、174-178頁、1999年）。ＭＣＨはそのノックアウトマウスが羸痩の phenotype を示すことから肥満に関与することが示されていたが（Shimada, M. et al.、Nature、396巻、670-674頁、1998年）、その受容体が明らかにされたことにより抗肥満薬としての可能性を有する受容体拮抗薬の探索が可能となった。また、urotensin IIはサルに静脈内投与すること

によって心虚血を惹起することから心循環系に強力な作用を示すことも報告されている（Ames, R. S. et al.、Nature、401巻、282-286頁、1999年）。

このように、オーファン受容体およびそのリガンドは新たな生理作用に関与する場合が多く、その解明は新たな医薬品開発に結びつくことが期待される。しかし、オーファン受容体のリガンド探索においては多くの困難さが伴い、これまでに数多くのオーファン受容体の存在が明らかにされながらそのリガンドが明らかにされた受容体はごく一部に過ぎない。

本発明者らは、オーファンＧタンパク質共役型受容体である新規受容体ＺＡＱ（本願明細書の配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質：以下、本明細書において、単にＺＡＱと称する場合がある）を見出したが、そのリガンドが何であるのかはこれまで不明であった。

オーファン受容体タンパク質であるＺＡＱに対するリガンドの探索と、ＺＡＱおよびそのリガンドを用いることを特徴とする化合物などのスクリーニング方法の確立が課題とされていた。

発明の開示

本発明者らは、牛乳抽出液中にＺＡＱ特異的なリガンド活性を有する物質が存在することを見出し、当該物質を分離し、構造決定をおこなった。さらに、本活性成分のヒト型ペプチドをコードする遺伝子を見出し、これを動物細胞に発現させたところ、培養上清中にＺＡＱ発現細胞を活性化するペプチド性物質が分泌されていることを確認した。

本発明者らは、かかる知見に基づいて、ＺＡＱおよびＺＡＱリガンドペプチドを用いたスクリーニング系を用いて、ＺＡＱの介在する疾患の治療薬（ＺＡＱ拮抗薬あるいは作動薬など、具体的には消化器疾患の予防・治療薬など）のスクリーニングができることを見出した。

すなわち、本発明は、

（１）配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、

（2）配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである前記（1）記載のペプチドまたはその塩、

（3）配列番号：２０で表わされるアミノ酸配列を含有する前記（1）記載のペプチドまたはその塩、

（4）配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有する前記（1）記載のペプチドまたはその塩、

（5）配列番号：２２または配列番号：２３で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする前記（1）記載のペプチドまたはその塩、

（6）前記（1）記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

（7）ＤＮＡである前記（6）記載のポリヌクレオチド、

（8）配列番号：２６または配列番号：２７で表される塩基配列を含有する前記（7）記載のＤＮＡ、

（9）配列番号：２８または配列番号：２９で表される塩基配列を含有する前記（7）記載のＤＮＡ、

（１０）前記（6）記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

（１１）前記（１０）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

（１２）前記（１１）記載の形質転換体を培養し、前記（1）記載のペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする前記（1）記載のペプチドまたはその塩の製造法、

（１３）前記（1）記載のペプチドまたはその塩に対する抗体、

（１４）前記（1）記載のペプチドまたはその塩および配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（１５）前記（1）記載のペプチドまたはその塩および配列番号：３６で表わされ

るアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（１６）前記（１）記載のペプチドまたはその塩および配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（１７）前記（１）記載のペプチドまたはその塩および配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（１８）前記（１４）記載のスクリーニング方法または前記（１６）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（１９）前記（１５）記載のスクリーニング方法または前記（１７）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（２０）前記（１８）または（１９）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（２１）消化器疾患の予防･治療剤である前記（２０）記載の医薬、

（２２）前記（1）記載のペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

（２３）消化器疾患の予防·治療剤である前記（２２）記載の医薬、

（２４）哺乳動物に対して、前記（１４）記載のスクリーニング方法または前記（１６）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする消化器疾患の予防・治療方法、

（２５）哺乳動物に対して、前記（１５）記載のスクリーニング方法または前記（１７）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする消化器疾患の予防・治療方法、

（２６）消化器疾患の予防・治療剤を製造するための前記（１４）記載のスクリーニング方法または前記（１６）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用、

（２７）消化器疾患の予防・治療剤を製造するための前記（１５）記載のスクリーニング方法または前記（１７）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用などを提供するものである。

さらには、本発明は、

（２８）配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列と約６０％以上（好ましくは約７０％以上、さらに好ましくは約８０％以上、より好ましくは約８５％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９

５％以上）の相同性を有するアミノ酸配列である前記（１）記載のペプチドまたはその塩、

（２９）配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～４０個程度、より好ましくは１～３０個程度、なかでも好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である前記（１）記載のペプチドまたはその塩、

（３０）（i）前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩とを接触させた場合と、（ii）前記（１）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする前記（１４）記載のスクリーニング方法、

（３１）（i）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩を配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、（ii）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物を配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩の配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする前記（１）

記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３２）（i）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩を配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物を配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩の当該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３３）（i）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩を配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、（ii）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物を配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩の当該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３４）（i）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩を、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質に接触させた場合と、（ii）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物を、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質

的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質に接触させた場合における、標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩の当該タンパク質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３５）（i）前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩とを接触させた場合と、（ii）前記（１）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする前記（１５）記載のスクリーニング方法、

（３６）（i）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩を配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、（ii）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物を配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩の配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３７）（i）標識した前記（１）記載のペプチドまたはその塩を配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタン

パク質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識した前記（1）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物を配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、標識した前記（1）記載のペプチドまたはその塩の当該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３８）（i）標識した前記（1）記載のペプチドまたはその塩を配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、（ii）標識した前記（1）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物を配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した前記（1）記載のペプチドまたはその塩の当該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３９）（i）標識した前記（1）記載のペプチドまたはその塩を、配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質に接触させた場合と、（ii）標識した前記（1）記載のペプチドまたはその塩および試験化合物を、配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質に接触させた場合における、標識した前記（1）記載のペプチドまたはその塩の当該タンパク質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配

列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（４０）前記（３０）～（３４）記載のスクリーニング方法で得られうる、(i) 前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（４１）前記（３５）～（３９）記載のスクリーニング方法で得られうる、(i) 前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（４２）前記（４０）または（４１）記載の化合物またはその塩を含有する医薬、

（４３）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞を含有することを特徴とする前記（１６）記載のスクリーニング用キット、

（４４）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする前記（１６）記載のスクリーニング用キット、

（４５）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質を含有することを特徴とする前記（１６）記載のスクリーニング用キット、

（４６）配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞を含有することを特徴とする前記（１７）記載のスクリーニング用キット、

（４７）配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする前記（１７）記載のスクリーニング用キット、

（４８）配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質を含有することを特徴とする前記（１７）記載のスクリーニング用キット、

（４９）前記（４３）～（４５）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（５０）前記（４６）～（４８）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（１）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（５１）前記（４９）または（５０）記載の化合物またはその塩を含有する医薬、

（５２）消化器疾患の予防·治療剤である前記（４２）または（５１）記載の医薬、

（５３）前記（１３）記載の抗体と、前記（１）記載のペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする、前記（１）記載のペプチドまたはその塩の定量法、

（５４）前記（１３）記載の抗体と、被検液および標識化された前記（１）記載のペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、当該抗体に結合した標識化された前記（１）記載のペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の前記（１）記載のペプチドまたはその塩の定量法、

（５４）被検液と担体上に不溶化した前記（１１）記載の抗体および標識化された前記（１１）項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の前記（１）記載のペプチドまたはその塩の定量法、

（５５）前記（７）記載のＤＮＡとハイストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

（５６）前記（７）記載のＤＮＡの塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、

（５７）配列番号：２８または配列番号：２９で表される塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有する前記（５６）記載のポリヌクレオチド、

（５８）前記（1）記載のペプチドまたはその塩および配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（５９）前記（1）記載のペプチドまたはその塩および配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（６０）前記（５８）記載のスクリーニング方法または前記（５９）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、前記（1）記載のペプチドまたはその塩と配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（６１）前記（６０）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（６２）消化器疾患の予防·治療剤である前記（６１）記載の医薬、

（６３）配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩および配列番号：1、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク

質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：１、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（６４）配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩および配列番号：１、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：１、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（６５）前記（６３）記載のスクリーニング方法または前記（６４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：１、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（６６）前記（６５）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（６７）消化器疾患の予防･治療剤である前記（６６）記載の医薬などを提供する。

図面の簡単な説明

図１は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＣ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図２に続

く）。

図２は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＣ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図１の続き、図３に続く）。

図３は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＣ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図２の続き）。

図４は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＴ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図５に続く）。

図５は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＴ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図４の続き、図６に続く）。

図６は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列（ＺＡＱＴ）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図５の続き）。

図７は本発明のヒト脳由来タンパク質の疎水性プロットを示す。

図８は実施例２で行われたＺＡＱの発現分布の解析結果を示す。

図９はＭＩＴ１、ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド（Aタイプ）およびヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド（Gタイプ）のアミノ酸配列を示す。図中、「ＭＩＴ1」はＭＩＴ１のアミノ酸配列を、「Ｈｕｍａｎ（Ａ ｔｙｐｅ）」はヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（Aタイプ）のアミノ酸配列を、「Ｈｕｍａｎ（Ｇ ｔｙｐｅ）」はヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（Gタイプ）のアミノ酸配列を、それぞれ示す。

図１０は実施例６（６－３）で行われた、精製ＺＡＱリガンドペプチドのＺＡＱ活性化作用の測定結果を示す。

図１１は実施例５（５－１）で用いたプラスミドｐＣＡＮ６１８の制限酵素地図を示す。

図１２は実施例８（８－３）で行われたヒト型ＺＡＱリガンドペプチドおよびＭ

ＩＴ１のＺＡＱ受容体活性化作用の測定結果を示す。図中、－○－はヒト型ＺＡＱリガンドペプチドを、－●－はＭＩＴ１を示す。

図１３は実施例８（８－３）で行われたヒト型ＺＡＱリガンドペプチドおよびＭＩＴ１のＩ５Ｅ受容体活性化作用の測定結果を示す。図中、－○－はヒト型ＺＡＱリガンドペプチドを、－●－はＭＩＴ１を示す。

図１４は実施例１１で行われた収縮作用の測定結果を示す。図中、－■－はヒト型ＺＡＱリガンドペプチドを、－●－はＭＩＴ１を示す。

図１５は実施例１２で行われたＺＡＱ膜画分を用いたバインディングアッセイの測定結果を示す。図中、－■－は可変濃度（横軸記載）のヒト型ＺＡＱリガンドペプチドを試験化合物として加えた場合の^{125}I-MIT1 特異的結合量を、－●－は同様にＭＩＴ１を試験化合物として加えた場合の^{125}I-MIT1 特異的結合量を示す。

図１６は実施例１２で行われたＩ５Ｅ膜画分を用いたバインディングアッセイの測定結果を示す。図中、－□－は可変濃度（横軸記載）のヒト型ＺＡＱリガンドペプチドを試験化合物として加えた場合の^{125}I-MIT1 特異的結合量を、－○－は可変濃度（横軸記載）のＭＩＴ１を試験化合物として加えた場合の^{125}I-MIT1 特異的結合量を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のペプチドまたはその塩は、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記することがある）と結合する能力を有するペプチドまたはその塩であり、本発明のタンパク質と結合し、活性化する能力を有するペプチドまたはその塩である。

さらに、本発明のペプチドまたはその塩は、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８または配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する能力を有するペプチドまたはその塩であり、当該タンパク質と結合し、活性化する能力も有するペプチドまたはその塩である。

なかでも好ましくは、本発明のペプチドまたはその塩は、配列番号：２０または

配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、本発明のタンパク質と結合し、活性化する能力を有することを特徴とするペプチドまたはその塩である。

本発明のペプチドまたはその塩の本発明のタンパク質と結合する能力および本発明のタンパク質を活性化する能力は後述の方法により測定することができる。

以下、本発明のペプチドまたはその塩を本発明のペプチドと略記する場合がある。

本発明のタンパク質（Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質）は、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列（図１〜図３または図４〜図６中のアミノ酸配列）と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体タンパク質である（以下、本発明のタンパク質またはその塩を本発明のタンパク質と略記する場合がある）。

本発明のペプチドおよび本発明のタンパク質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、ＭＥＬ，Ｍ１，ＣＴＬＬ－２，ＨＴ－２，ＷＥＨＩ－３，ＨＬ－６０，ＪＯＳＫ－１，Ｋ５６２，ＭＬ－１，ＭＯＬＴ－３，ＭＯＬＴ－４，ＭＯＬＴ－１０，ＣＣＲＦ－ＣＥＭ，ＴＡＬＬ－１，Ｊｕｒｋａｔ，ＣＣＲＴ－ＨＳＢ－２，ＫＥ－３７，ＳＫＷ－３，ＨＵＴ－７８，ＨＵＴ－１０２，Ｈ９，Ｕ９３７，ＴＨＰ－１，ＨＥＬ，ＪＫ－１，ＣＭＫ，ＫＯ－８１２，ＭＥＧ－０１など）、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管

（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するペプチド・タンパク質であってもよく、また合成ペプチド・合成タンパク質であってもよい。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質がシグナル配列を有している場合は当該ペプチドまたはタンパク質を効率良く細胞外に分泌させることができる。

配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列と約６０％以上（好ましくは約７０％以上、さらに好ましくは約８０％以上、より好ましくは約８５％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の性質を有するペプチドなどが好ましい。

以下、配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドと記載することがある。

配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましく、具体的には配列番号：２０、配列番号：２１、配列番号：２２または配列番号：２３で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド等が挙げられる。

以下、配列番号：２２または配列番号：２３で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドと記載することがある。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のタンパク質に対する結合活性、本発明のタンパク質を介するシグナル情報伝達作用、消化管（例、腸管）収縮活性

などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、本発明のタンパク質に対する結合活性、本発明のタンパク質を介するシグナル情報伝達作用、消化管収縮活性などの活性が同等（例、約０．５～２倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やペプチドの分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

これらの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法などに従っても測定することができる。

また、本発明のペプチドとしては、①配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～４０個程度、より好ましくは１～３０個程度、なかでも好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：２０または配列番号：２１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～２０個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドなども用いられる。

本発明のペプチドとして好ましくはヒトまたはヒト以外の哺乳動物、さらに好ましくはヒト由来のペプチドである。

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

本発明の配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：１で表わされるア

ミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約０．５～２倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述の決定方法やスクリーニング方法に従っても測定することができる。

以下、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をＺＡＱと記載することがある。

また、本発明のタンパク質としては、①配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：１で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と実

質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましく、具体的にはWO　９８／４６６２０に記載のタンパク質などが挙げられる。

配列番号：４０で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：４０で表わされるアミノ酸配列と約９７％以上、好ましくは約９８％以上、より好ましくは約９９％以上、最も好ましくは約９９．５％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：４０で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：４０で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４０で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：４０で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：４０で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４０で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列と約９５％以上、好ましくは約９６％以上、より好ましくは約９７％以上、最も好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４７で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：４８で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：４８で表わされるアミノ酸配列と約９５％以上、好ましくは約９６％以上、より好ましくは約９７％以上、最も好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：４８で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：４８で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４８で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：４８で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：４８で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４８で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましく、具体的には、Biochem. Biophys. Acta、1491巻、369-375頁、2000年に記載のタンパク質などが挙げられる。

配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と約９５％以上、好ましくは約９６％以上、より好ましくは約９７％以上、最も好ましくは約９８％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：４９で表わされるアミノ

酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましく、具体的にはWO ９８／４６６２０に記載のタンパク質などが挙げられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約０．５～２倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができる。

配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：３４で表わされるアミノ酸配列と約６０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、最も好ましくは約９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：３４で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：３４で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：３４で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、回腸収縮作用、遠位大腸収縮作用、近位大腸弛緩作用など）を有するペプチドなどが好ましく、具体的には後述のＭＩＴ１などが挙げられる。

本明細書におけるペプチドおよびタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がＮ末端（アミノ末端）、右端がＣ末端（カルボキシル末端）である。配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする本発明のタンパク質は、Ｃ末端がカルボキシル基（$-COOH$）、カルボキシレート（$-COO^-$）、アミド（$-CONH_2$）またはエステル（$-COOR$）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるＲとしては、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピルもしくはｎ－ブチルなどのC_{1-6}アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC_{3-8}シクロアルキル基、例えば、フェニル、α－ナフ

チルなどのC_{6-12}アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－C_{1-2}アルキル基もしくはα－ナフチルメチルなどのα－ナフチル－C_{1-2}アルキル基などのC_{7-14}アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のペプチド・タンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のペプチド・タンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のペプチド・タンパク質には、上記したペプチド・タンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{2-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、－OH、－SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{2-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチド・糖タンパク質などの複合ペプチド・複合タンパク質なども含まれる。

本発明のペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：２０で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）のペプチド、または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）のペプチドなどがあげられる。さらに好ましくは、配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のペプチドなどがあげられる。

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）のタンパク質などがあげられる。

本発明のタンパク質の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のタンパク質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のリガンド結合活性を有するものなどが用

いられる。

具体的には、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質の部分ペプチドとしては、図７で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも２０個以上、好ましくは５０個以上、より好ましくは１００個以上のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約５０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、さらに好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質のリガンド結合活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質のリガンド結合活性」の測定は公知の方法に準じて行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、前記アミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、より好ましくは１～５個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはＣ末端がカルボキシル基（$-COOH$）、カルボキシレート（$-COO^-$）、アミド（$-CONH_2$）またはエステル（$-COOR$）の何れであってもよい。本発明の部分ペプチドがＣ末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば前記したＣ末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したＧｌｎがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８または配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８または配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、タンパク質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のリガンド結合活性を有するものなどが用いられる。当該部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記タンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも２０個以上、好ましくは５０個以上、より好ましくは１００個以上のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい。実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約５０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、さらに好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチド等の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のペプチドもしくはタンパク質またはその塩、および配列番号：３６、配列番号：４０もしくは配列番号：４７で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から公知のペプチド・タンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のペプチド、本発明のタンパク質、配列番号：３６、配列番号：４０または配列番号：４

７で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド・タンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。さらに、配列番号：４８で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩は、Biochem. Biophys. Acta、1491巻、369-375頁、2000年に記載の方法に準じて製造できる。配列番号：４９で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩は、ＷＯ ９８／４６６２０に記載の方法に準じて製造できる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、当該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらのアミド体またはそれらの塩の合成には、通常市販のペプチド・タンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、４－ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、４－メチルベンズヒドリルアミン樹脂、ＰＡＭ樹脂、４－ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃアミノエチル）フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、α－アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチド・タンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチド・タンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のペプチド・タンパク質またはそれらのアミド体を取得する。

前記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド・タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、ＤＣＣ、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロリル）カルボジイミドなどが用いられる

。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、ＨＯＢｔ、ＨＯＯＢｔ）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはＨＯＢｔエステルあるいはＨＯＯＢｔエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド・タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド，Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド，Ｎ－メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン，クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン，ジオキサン，テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル，プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル，酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－２０℃～５０℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常１．５～４倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Ｚ、Ｂｏｃ、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、４－メトキシベンジルオキシカルボニル、Ｃｌ－Ｚ、Ｂｒ－Ｚ、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、２－ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Ｆｍｏｃなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、２－アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、４－ニトロベンジルエステル、４－メトキシベンジルエステル、４－クロロベンジルエ

ステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Ｂｚｌ、Cl_2－Ｂｚｌ、２－ニトロベンジル、Ｂｒ－Ｚ、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Ｔｏｓ、４－メトキシ－２，３，６－トリメチルベンゼンスルホニル、ＤＮＰ、ベンジルオキシメチル、Ｂｕｍ、Ｂｏｃ、Ｔｒｔ、Ｆｍｏｃなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、２，４，５－トリクロロフェノール、２，４－ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、ＨＯＮＢ、Ｎ－ヒドロキシスクシミド、Ｎ－ヒドロキシフタルイミド、ＨＯＢｔ）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Ｐｄ－黒あるいはＰｄ－炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約－２０℃～４０℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、１，４－ブタンジチオール、１，２－エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加

が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる２，４－ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の１，２－エタンジチオール、１，４－ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護、保護基の脱離、および反応に関与する官能基の活性化などは公知の手段から、官能基の保護に用いる保護基は公知の基からそれぞれ適宜選択され、適用される。

ペプチド・タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、当該ペプチド鎖のＮ末端のα－アミノ基の保護基のみを除いたペプチド・タンパク質とＣ末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したペプチド・タンパク質とを製造し、この両ペプチド・両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチド・保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチド・粗タンパク質を得ることができる。この粗ペプチド・粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチド・タンパク質のアミド体を得ることができる。

ペプチド・タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチド・タンパク質のアミド体と同様にして、所望のペプチド・タンパク質のエステル体を得ることができる。

本発明のペプチドは、公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。また、本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドもしくは本発明のタンパク質を構成し得る部

分ペプチドまたはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①〜⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 タンパク質の化学IV, 205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドまたは本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドまたは部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のペプチド・タンパク質をコードするＤＮＡとしては、前述した本発明のペプチド・タンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalＲＮＡまたはｍＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、ＲＴ－ＰＣＲ法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２６または配列番号：２７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列

番号：２６または配列番号：２７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡを含有し、本発明のペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明のタンパク質に対する結合活性、本発明のタンパク質を介するシグナル情報伝達作用、消化管（例、腸管）収縮活性など）を有するペプチドをコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：２６で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとしては、配列番号：２８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ等が挙げられる。

配列番号：２６で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２６で表わされる塩基配列と約６０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：２７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとしては、配列番号：２９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ等が挙げられる。

配列番号：２７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２７で表わされる塩基配列と約６０％以上、好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

また、本発明のタンパク質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡを含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モ

レキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９～４０mM、好ましくは約１９～２０mMで、温度が約５０～７０℃、好ましくは約６０～６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９mMで温度が約６５℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：２０で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：２６で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：２７で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：２２で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：２８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられ、配列番号：２３で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするＤＮＡとしては、配列番号：２９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられる。

また、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡがあげられる。

本発明のペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）とは、本発明のペプチドをコードするＤＮＡを包含するだけではなく、ＲＮＡをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明のペプチドの遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）は、本発明のペプチドの

遺伝子のＲＮＡとハイブリダイズすることができ、当該ＲＮＡの合成又は機能を阻害することができるか、あるいは本発明のペプチド関連ＲＮＡとの相互作用を介して本発明のペプチドの遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のペプチド関連ＲＮＡの選択された配列に相補的な（オリゴ）ヌクレオチド、及び本発明のペプチド関連ＲＮＡと特異的にハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドは、生体内及び生体外で本発明のペプチドの遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。

用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチドとの間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチドのアミノ酸を通常指している。本発明のペプチドの遺伝子の５’端ヘアピンループ、５’端６－ベースペア・リピート、５’端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ＯＲＦ翻訳開始コドン、３’端非翻訳領域、３’端パリンドローム領域、及び３’端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、本発明のペプチドの遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と対象領域の少なくとも一部に相補的な（オリゴ）ヌクレオチドとの関係、すなわち対象物とハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチドは、２－デオキシ－Ｄ－リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、Ｄ－リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のＮ－グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、当該ポリマーはＤＮＡやＲＮＡ中に見出されるような塩基のペアリナグや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、２本鎖ＤＮＡ、１本鎖ＤＮＡ、２本鎖ＲＮＡ、１本鎖ＲＮＡ、さらにＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られ

た標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、１個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーＬーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、αアノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば１個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス核酸は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示が

ある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の３’端あるいは５’端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の３’端あるいは５’端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、ＲＮａｓｅなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。当該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりｍＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、ＲＴ－ＰＣＲ法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡの部分塩基配

列を含有するＤＮＡ、または②配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡを含有し、本発明のタンパク質ペプチドと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするＤＮＡの部分塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２または配列番号：３で表わされる塩基配列と約９０％以上、好ましくは約９５％以上、より好ましくは約９８％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明のペプチドを完全にコードするＤＮＡのクローニングの手段としては、本発明のペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列の部分塩基配列を含有する合成ＤＮＡプライマーを用いてＰＣＲ法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだＤＮＡを本発明のペプチドの一部あるいは全領域をコードするＤＮＡ断片もしくは合成ＤＮＡを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）２nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する）を完全にコードするＤＮＡのクローニングも本発明のペプチドを完全にコードするＤＮＡのクローニングと同様にして行うことができる。

ＤＮＡの塩基配列の変換は、ＰＣＲや公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan™-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたペプチド・タンパク質をコードするＤＮＡは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用する

ことができる。当該ＤＮＡはその５’末端側に翻訳開始コドンとしてのＡＴＧを有し、また３’末端側には翻訳終止コドンとしてのＴＡＡ、ＴＧＡまたはＴＡＧを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成ＤＮＡアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のペプチド・タンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のペプチド・タンパク質をコードするＤＮＡから目的とするＤＮＡ断片を切り出し、（ロ）当該ＤＮＡ断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、ｐＢＲ３２２，ｐＢＲ３２５，ｐＵＣ１２，ｐＵＣ１３）、枯草菌由来のプラスミド（例、ｐＵＢ１１０，ｐＴＰ５，ｐＣ１９４）、酵母由来プラスミド（例、ｐＳＨ１９，ｐＳＨ１５）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス，ワクシニアウイルス，バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、ｐＡ１－１１、ｐＸＴ１、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＲｃ／ＲＳＶ、ｐｃＤＮＡＩ／Ｎｅｏ、ｐｃＤＮＡ３．１、ｐＲｃ／ＣＭＶ２、ｐＲｃ／ＲＳＶ（Invitrogen社）などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、ＳＲαプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＨＩV-ＬＴＲプロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＨＳV-ＴＫプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、ＣＭＶプロモーター、ＳＲαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｒｅｃＡプロモーター、λP_Lプロモーター、ｌｐｐプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、ＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーター、ｐｅｎＰプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、Ｐ１０プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー、ＳＶ４０複製オリジン（以下、ＳＶ４

０ｏｒｉと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、ｄｈｆｒと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（ＭＴＸ）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、Ｇ４１８耐性）等が挙げられる。特に、ＣＨＯ（$dhfr^-$）細胞を用いてｄｈｆｒ遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のＮ端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、ＰｈｏＡ・シグナル配列、ＯｍｐＡ・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α－アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、ＭＦα・シグナル配列、ＳＵＣ２・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α－インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のペプチド・タンパク質をコードするＤＮＡを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）Ｋ１２・ＤＨ１〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. . Sci. USA），６０巻，１６０（１９６８）〕，ＪＭ１０３〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ，（Nucleic Acids Research），９巻，３０９（１９８１）〕，ＪＡ２２１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Biology），１２０巻，５１７（１９７８）〕，ＨＢ１０１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー，４１巻，４５９（１９６９）〕，Ｃ６００〔ジェネティックス（Genetics），３９巻，４４０（１９５４）〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス（Bacillus subtilis）ＭＩ１１４〔ジーン，２４巻，２５５（１９８３）〕，２０７－２１〔ジャーナル・オブ

・バイオケミストリー（Journal of Biochemistry），９５巻，８７（１９８４）〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）ＡＨ２２，ＡＨ２２Ｒ$^{-}$，ＮＡ８７－１１Ａ，ＤＫＤ－５Ｄ，２０Ｂ－１２、シゾサッカロマイセス・ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）ＮＣＹＣ１９１３，ＮＣＹＣ２０３６、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがＡｃＮＰＶの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（Spodoptera frugiperda cell；Ｓｆ細胞）、Trichoplusia niの中腸由来のＭＧ１細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがＢｍＮＰＶの場合は、蚕由来株化細胞（Bombyx mori N；ＢｍＮ細胞）などが用いられる。当該Ｓｆ細胞としては、例えば、Ｓｆ９細胞（ATCC CRL1711）、Ｓｆ２１細胞（以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ（In Vivo），13, 213-217,(1977)）などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー（Nature），３１５巻，５９２（１９８５）〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞ＣＯＳ－７，Ｖｅｒｏ，チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ細胞と略記），ｄｈｆｒ遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ（ｄｈｆｒ$^{-}$）細胞と略記），マウスＬ細胞，マウスＡｔＴ－２０，マウスミエローマ細胞，ラットＧＨ３，ヒトＦＬ細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. . Sci. USA），６９巻，２１１０（１９７２）やジーン（Gene），１７巻，１０７（１９８２）などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス（Molecular & General Genetics），１６８巻，１１１（１９７９）などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メッソズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology)，１９４巻，１８２－１８７（１９９１）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA)，７５巻，１９２９(１９７８)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー（Bio/Technology）、６、４７－５５（１９８８））などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊８　新　細胞工学実験プロトコール．２６３－２６７（１９９５）（秀潤社発行）、ヴィロロジー（Virology），５２巻，４５６（１９７３）に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、Ｇタンパク質共役型タンパク質をコードするＤＮＡを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には当該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のｐＨは約５～８が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むＭ９培地〔ミラー（Miller)，ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス（Journal of Experiments in Molecular Genetics)，４３１－４３３，Cold Spring Harbor Laboratory, New York １９７２〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、３β－インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約１５～４３℃で約３～２４時間行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約３０～４０℃で約６～２４時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー（Burkholder）最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. . Sci. USA），７７巻，４５０５(１９８０)〕や0.５%カザミノ酸を含有するＳＤ培地〔Bitter, G. A. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. . Sci. USA），８１巻，５３３０（１９８４）〕が挙げられる。培地のｐＨは約５～８に調整するのが好ましい。培養は通常約２０℃～３５℃で約２４～７２時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium（Grace, T.C.C.,ネイチャー（Nature）,195,788(1962)）に非動化した１０％ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のｐＨは約６．２～６．４に調整するのが好ましい。培養は通常約２７℃で約３～５日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約５～２０％の胎児牛血清を含むＭＥＭ培地〔サイエンス（Science），１２２巻，５０１(１９５２)〕，ＤＭＥＭ培地〔ヴィロロジー（Virology），８巻，３９６(１９５９)〕，ＲＰＭＩ １６４０培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション（The Journal of the American Medical Association）１９９巻，５１９(１９６７)〕，１９９培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン（Proceeding of the Society for the Biological Medicine），７３巻，１(１９５０)〕などが用いられる。ｐＨは約６～８であるのが好ましい。培養は通常約３０℃～４０℃で約１５～６０時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のペプチド・タンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のペプチド・タンパク質を分離精製するには、例えば、下

記の方法により行なうことができる。

本発明のペプチド・タンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンＸ－１００^{TM}などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にペプチド・タンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるペプチド・タンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

このようにして得られるペプチド・タンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するペプチド・タンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ペプチド・ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

このようにして生成する本発明のペプチドの活性は、標識した本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッ

セイなどにより測定することができる。

また、生成する本発明のタンパク質の活性は、標識した本発明のペプチドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のペプチド・タンパク質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のペプチド・タンパク質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（ａ）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のペプチド・タンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常２～６週毎に１回ずつ、計２～１０回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の２～５日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化した本発明のペプチド・タンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature)、２５６巻、４９５頁（１９７５年）〕に従い実施

することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはＰＥＧが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、ＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０などが挙げられるが、Ｐ３Ｕ１が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は１：１～２０：１程度であり、ＰＥＧ（好ましくは、ＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００）が１０～８０％程度の濃度で添加され、約２０～４０℃、好ましくは約３０～３７℃で約１～１０分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明のペプチド・タンパク質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインＡを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインＡを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のペプチド・タンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、１～２０％、好ましくは１０～２０％の牛胎児血清を含むＲＰＭＩ　１６４０培地、１～１０％の牛胎児血清を含むＧＩＴ培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（ＳＦＭ－１０１、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常２０～４０℃、好ましくは約３７℃である。培養時間は、通常５日～３週間、好ましくは１週間～２週間である。培養は、通常５％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（ｂ）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、ＤＥＡＥ）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインＡあるいはプロテインＧなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明のペプチド・タンパク質等の抗原）とキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、当該免疫動物から本発明のペプチド・タンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン１に対し、約０．１～２０、好ましくは約１～５の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約２～６週毎に１回ずつ、計約３～１０回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のペプチド、本発明のペプチドをコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）および本発明のペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、①本発明のペプチドが関与する各種疾病の予防・治療剤、②本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング、③本発明のペプチドまたはその塩の定量、④遺伝子診断剤、⑤アンチセンスＤＮＡを含有する医薬、⑥本発明の抗体を含有する医薬、⑦本発明のＤＮＡを含有する非ヒト動物の作出、⑧構造的に類似したリガンド・受容体との比較にもとづいたドラッグデザイン、などの実施のために有用である。

特に、本発明の組換えタンパク質の発現系を用いた受容体結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な本発明のタンパク質に対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、ＺＡＱアゴニスト、ＺＡＱアンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、当該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のペプチド、本発明のＤＮＡおよび本発明の抗体の用途について、以下に具体的に説明する。

（１）本発明のペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

後述の実施例に記載したように、本発明のペプチドは、生体内で液性因子として存在し、本発明のタンパク質を活性化し、本発明のタンパク質を発現した細胞の細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度を上昇させることから、本発明のタンパク質（Ｇタンパク質共役型受容体）のリガンドであることが明らかとなった。

また、本発明のペプチドは、ヘビ毒 Mamba Intestinal Toxin 1（ＭＩＴ１と略称することもある；配列番号：３４；Toxicon、28巻、847-856頁、1990年；FEBS Letters、 461巻、183-188頁、1999年）とアミノ酸レベルで約５６％の相同性が認められる。

ＭＩＴ１は回腸や遠位大腸の収縮、あるいは近位大腸の弛緩を引き起こし、その程度は40 mM塩化カリウムに匹敵するほど強いことが報告されている（FEBS Letters

、461巻、183-188頁、1999年）が、その作用点や作用メカニズムは解明されていなかった。本発明者らはＭＩＴ１の作用も本発明のタンパク質を介して発現されていることを明らかにした。

以上のことから、本発明のペプチドは、腸管全体の収縮あるいは弛緩を引き起こし、腸管の運動（消化活動）などを制御する活性を有する（例、後述の実施例１１）。したがって、本発明のＤＮＡ等が欠損している場合あるいは発現量が異常に減少している場合、例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）等、種々の疾病が発症する。

したがって、本発明のペプチドおよび本発明のＤＮＡは例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）等、種々の疾病の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のペプチドが減少あるいは欠損しているために、本発明のタンパク質が発現している細胞における情報伝達が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、（イ）本発明のＤＮＡを当該患者に投与し、生体内で本発明のペプチドを発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のＤＮＡを挿入し、本発明のペプチドを発現させた後に、当該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のペプチドを当該患者に投与すること等によって、当該患者における本発明のペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のＤＮＡを上記の治療・予防剤として使用する場合は、当該ＤＮＡを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のＤＮＡは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも９０％、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エ

リキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤等の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤等に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤等が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油等のような天然産出植物油等を溶解または懸濁させる等の通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウム等）等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０等）等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール等）、酸化防止剤等と配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のＤＮＡが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口

的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えばヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。

本発明のペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、消化器疾患の治療目的で本発明のペプチドを経口投与する場合、一般的に成人（６０ｋｇとして）においては、一日につき本発明のペプチドを約１ｍｇ～１０００ｍｇ、好ましくは約１０～５００ｍｇ、より好ましくは約１０～２００ｍｇ投与する。非経口的に投与する場合は、本発明のペプチドの１回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、消化器疾患の治療目的で本発明のペプチドを注射剤の形で成人（体重６０ｋｇとして）に投与する場合、一日につき当該ペプチドを約１～１０００ｍｇ程度、好ましくは約１～２００ｍｇ程度、より好ましくは約１０～１００ｍｇ程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（２）本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング

本発明のペプチドおよび本発明のタンパク質ならびに部分ペプチドを用いることを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、または本発明のペプチドおよび本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット（以下、本発明のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング用キットと略記する）について以下に詳述する。

本発明のタンパク質を用いるか、または組換え型本発明のタンパク質の発現系を構築し、当該発現系を用いた本発明のペプチドとの結合アッセイ系（リガンド・受容体アッセイ系）を用いることによって、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合

成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。

このような化合物には、本発明のタンパク質を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（ＺＡＱアゴニスト）と当該細胞刺激活性を有しない化合物（ＺＡＱアンタゴニスト）などが含まれる。「本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる」とは、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合を阻害する場合と促進する場合の両方を包含するものである。

すなわち、本発明は、（ｉ）本発明のタンパク質に、本発明のペプチドを接触させた場合と（ｉｉ）上記した本発明のタンパク質に、本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（ｉ）上記した本発明のタンパク質に本発明のペプチドを接触させた場合と（ｉｉ）上記した本発明のタンパク質に本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば当該本発明のタンパク質に対する本発明のペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して比較する。

本発明のスクリーニング方法は具体的には、

①標識した本発明のペプチドを、上記した本発明のタンパク質に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの本発明のタンパク質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識した本発明のペプチドを本発明のタンパク質を含有する細胞または当該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞または当該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの当該細胞または当該膜画分に対する結合量を測定し比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を

変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識した本発明のペプチドを、本発明のタンパク質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの本発明のタンパク質に対する結合量を測定し比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のペプチドを本発明のタンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のペプチドを、本発明のタンパク質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質に接触させた場合における、本発明のタンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のタンパク質としては、上記の本発明のタンパク質を含有するものであれば何れのものであってもよい。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明のタンパク質などが適している。

本発明のタンパク質を製造するには、前述の方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のタンパク質を含有する細胞あるいは当該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明のタンパク質を含有する細胞を用いる場合、当該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明のタンパク質を含有する細胞としては、本発明のタンパク質を発現した宿主細胞をいうが、当該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破砕した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter−Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速（５００ｒｐｍ～３０００ｒｐｍ）で短時間（通常、約１分～１０分）遠心し、上清をさらに高速（１５０００ｒｐｍ～３００００ｒｐｍ）で通常３０分～２時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。当該膜画分中には、発現した本発明のタンパク質と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

当該本発明のタンパク質を含有する細胞や膜画分中の本発明のタンパク質の量は、１細胞当たり10^3～10^8分子であるのが好ましく、10^5～10^7分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一

ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当な本発明のタンパク質画分と、標識した本発明のペプチドが用いられる。本発明のタンパク質を含む画分としては、天然型の本発明のタンパク質を含む画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型の本発明のタンパク質を含む画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した本発明のペプチドとしては、例えば〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{35}S〕などで標識された本発明のペプチドなどを利用することができる。特に、ボルトン－ハンター試薬を用いて公知の方法で調製した本発明のペプチドの標識体を利用することもできる。

具体的には、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明のタンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより受容体標品を調製する。バッファーには、ｐＨ４～１０（望ましくはｐＨ６～８）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどのリガンドと受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、ＣＨＡＰＳ、Ｔｗｅｅｎ－８０$^{\mathrm{TM}}$（花王－アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明のタンパク質や本発明のペプチドの分解を抑える目的でＰＭＳＦ、ロイペプチン、Ｅ－６４（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。０．０１ｍｌ～１０ｍｌの当該受容体溶液に、一定量（５０００ｃｐｍ～５０００００ｃｐｍ）の標識した本発明のペプチドを添加し、同時に10^{-4}～10^{-1} μMの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（ＮＳＢ）を知るために大過剰の未標識の本発明のペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は０℃から５０℃、望ましくは４℃から３７℃で２０分から２４時間、望ましくは３０分から３時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ－カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B_0）から非特異的結合量（ＮＳＢ）を引いたカウント（B_0－ＮＳＢ）を１

００％とした時、特異的結合量（Ｂ－ＮＳＢ）が例えば５０％以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

また、本発明のタンパク質と本発明のペプチドとの結合を測定する方法として、ＢＩＡｃｏｒｅ（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いることもできる。この方法では、本発明のペプチドを装置に添付のプロトコールに従ったアミノカップリング法によってセンサーチップに固定し、本発明のタンパク質を含有する細胞または本発明のタンパク質をコードするＤＮＡを含有する形質変換体から精製した本発明のタンパク質または本発明のタンパク質を含む膜画分、あるいは精製した本発明のタンパク質または本発明のタンパク質を含む膜画分および試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を毎分２－２０μｌの流量で通過させる。 センサーチップ上の本発明のペプチドと本発明のタンパク質とが結合することによって生じる表面プラズモン共鳴の変化を共存する試験化合物が変化させることを観察することによって本発明のタンパク質と本発明のペプチドとの結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。この方法は、本発明のタンパク質をセンサーチップに固定し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を通過させる方法を用いても同様に測定することができる。試験化合物としては、上記と同様のものなどがあげられる。

本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、本発明のタンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ｃａ$^{2+}$遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明のタンパク質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の

指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、当該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、ｃＡＭＰ産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明のタンパク質を発現した細胞が用いられる。本発明のタンパク質を発現した細胞としては、前述の組換え型本発明のタンパク質発現細胞株などが望ましい。形質転換体である本発明のタンパク質発現細胞は安定発現株でも一過性発現株でも構わない。また、動物細胞の種類は上記と同様のものが用いられる。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

上記のリガンド・レセプターアッセイ系について、さらに具体的に記載すると以下のような（１）～（１２）のアッセイ系が用いられる。

（１）受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のＧタンパクが活性化されてＧＴＰが結合する。この現象は受容体発現細胞の膜画分においても観察される。通常、ＧＴＰは加水分解されてＧＤＰへと変化するが、このとき反応液中にＧＴＰγＳを添加しておくとＧＴＰγＳはＧＴＰと同様にＧタンパクに結合するが、加水分解されずにＧタンパクを含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したＧＴＰγＳを用いると細胞膜に残存した放射活性を測定することによって受容体アゴニストの受容体発現細胞刺激活性を測定することができる。この反応を利用して本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することができる。この方法は、前記④～⑤のように本発明のタンパク質を含む細胞を用いるものではなく、①～③のように本発明のタンパク質を含む膜画分を用いるアッセイ法であるが、④～⑤のように細胞刺激活性を測定するものであり、本測定法において本発明のタンパク質を含む膜画分へのＧＴＰγＳ結合促進活性を示す物質はアゴニストである。ここにおいて、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、本発明のペプチドの単独投与に比べて本発明

のタンパク質を含む細胞膜画分へのＧＴＰγＳ結合促進活性に変化が生じることを観察することによって本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。このとき、本発明のペプチドによる本発明のタンパク質を含む細胞膜画分へのＧＴＰγＳ結合促進活性を抑制する活性を示す化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、本発明のタンパク質を含む細胞膜画分へのＧＴＰγＳ結合促進活性を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一例についてより具体的に以下に述べる。本発明のタンパク質を含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液（50 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 1 μM GDP, 0.1% BSA pH 7.4）で希釈する。希釈率は、本発明のタンパク質の発現量により異なる。これをFalcon2053に0.2mlずつ分注し、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を加え、さらに終濃度200 pMとなるように[^{35}S] GTPγSを加える。25℃で1時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液（50 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 0.1% BSA , 0.05% CHAPS pH 7.4 1.5ml）を加えて、ガラス繊維ろ紙ＧＦ／Ｆでろ過する。６５℃、３０分保温して乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙上に残った膜画分に結合した[^{35}S] GTPγSの放射活性を測定する。本発明のペプチドのみを加えた実験区の放射活性を１００％、本発明のペプチドを加えなかった実験区の放射活性を０％とし、本発明のペプチドによるＧＴＰγＳ結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。ＧＴＰγＳ結合促進活性が例えば５０％以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

（２）本発明のタンパク質の発現細胞は本発明のペプチドの刺激によって細胞内ｃＡＭＰ量が減少する。この反応を利用して本発明のペプチドの本発明のタンパク質の発現細胞に対する刺激活性を測定することができる。

本発明のタンパク質を発現させた種々の動物細胞のｃＡＭＰ産生量はマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗ｃＡＭＰ抗体と^{125}Ｉ標識ｃＡＭＰ（ともに市販品）を使用することによってＲＩＡあるいは抗ｃＡＭＰ抗体と標識ｃＡＭＰとを組み合わせた他のＥＩＡ系でも測定することができる。また抗ｃ

ＡＭＰ抗体をプロテインＡあるいは抗ｃＡＭＰ抗体産生に用いた動物のＩｇＧなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと^{125}Ｉ標識ｃＡＭＰとを使用するＳＰＡ法による定量も可能である（アマシャムファルマシアバイオテク製のキットを使用する）。

ｃＡＭＰ産生抑制のアッセイにおいて、フォルスコリンまたはcalcitoninなど細胞内ｃＡＭＰ量を増加させるようなリガンドなどによって細胞内ｃＡＭＰ量を上昇させ、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加することによって本発明のペプチドの単独投与による細胞内ｃＡＭＰ量の抑制が変化することを観察し、本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。このとき、本発明のペプチドによる本発明のタンパク質の発現細胞のｃＡＭＰ産生抑制活性を阻害する活性を示す化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを添加してｃＡＭＰ産生抑制活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

スクリーニング法をより具体的に以下に記載する。本発明のタンパク質発現ＣＨＯ細胞（ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞；後述の実施例３（３－５））を２４穴プレートに5x10^{4} cell/wellで播種し、４８時間培養する。細胞を0.2mM ３－イソブチル－メチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄する（以下、0.2mM ３－イソブチル－メチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ）。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて３０分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、2μMフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーに1 nMの本発明のペプチドあるいは1 nMの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加したものを細胞に加え、３７℃で２４分間反応させる。１００μlの２０％過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で１時間置くことにより細胞内ｃＡＭＰを抽出する。抽出液中のｃＡＭＰ量は、ｃＡＭＰ ＥＩＡキット（アマシャムファルマシアバイオテク）を用いて測定する。フォルスコリン刺激によって産生されたｃＡＭＰ量を１００％とし、1 nMの本発明のペプチドの添加によって抑制されたｃＡＭＰ量を０％として、本発明のペプチドによるｃＡＭＰ産生抑制活

性に対する試験化合物の影響を算出する。本発明のペプチドの活性を阻害してｃＡＭＰ産生活性が例えば５０％以上になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

ｃＡＭＰ産生促進活性を測定するには、フォルスコリンを添加せずに本発明のタンパク質発現ＣＨＯ細胞に試験化合物を添加して産生されたｃＡＭＰを上記の方法で定量する。

（３）ＣＲＥ（cAMP response element）を含むＤＮＡを、ピッカジーン・ベイシックベクターまたはピッカジーン・エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））のルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、これをＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクターとする。ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクターをトランスフェクションした細胞において、ｃＡＭＰ上昇を伴う刺激は、ＣＲＥを介したルシフェラーゼ遺伝子発現とそれに引き続くルシフェラーゼタンパク質の産生を誘導する。つまり、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のｃＡＭＰ量の変動を検出することができる。ＣＲＥ－レポーター遺伝子ベクターを本発明のタンパク質発現細胞にトランスフェクションした細胞を利用して本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。具体的なスクリーニング法を以下に記す。

ＣＲＥ－レポーター遺伝子を導入した本発明のタンパク質発現細胞を２４穴プレートに$5x10^3$ cell/wellで播種し、４８時間培養する。細胞を0.2mM　３－イソブチルーメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄する（以下、0.2mM　３－イソブチルーメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ）。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて３０分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、1 nMの本発明のペプチドあるいは1 nMの本発明のペプチドおよび試験化合物と2μMフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、３７℃で２４分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、

液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の影響はルシフェラーゼによる発光量を本発明のペプチドを単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、本発明のペプチドの投与によりフォルスコリン刺激による発光量の増加が抑制されるが、この抑制を回復させる化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、フォルスコリン刺激によって上昇した発光量の本発明のペプチドと同様な抑制を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ以外に例えばアルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼあるいはβ－ガラクトシダーゼを用いることもできる。これらのレポーター遺伝子の遺伝子産物の酵素活性は以下のように市販の測定キットを用いて容易に測定することができる。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530によって、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chrolamphenicol Acetyltransferase Assay Kitによって、β－ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEによって測定することができる。

（４）本発明のタンパク質発現細胞は、本発明のペプチドによる刺激の結果、アラキドン酸代謝物を細胞外に放出する。あらかじめ、放射活性を有するアラキドン酸を細胞に取り込ませておくことによって、この活性を細胞外に放出された放射活性を測定することによって測定することができる。このとき、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加して、本発明のペプチドのアラキドン酸代謝物放出活性に対する影響を調べることにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。このとき、本発明のペプチドによるアラキドン酸代謝物放出活性を阻害する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。また、試験化合物のみを添加し、本発明のタンパク質発現細胞のアラキドン酸代謝物放出活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうこともできる。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に影響を与える化合物のスクリ

ーニング法より具体的に以下に述べる。

本発明のタンパク質発現ＣＨＯ細胞を２４穴プレートに5x10^4 cell/wellで播種し、２４時間培養後、[^{3}H] アラキドン酸を0.25 μCi/wellとなるよう添加する。[^{3}H] アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー (pH7.4) で洗浄し、各wellに0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー (pH7.4) に溶解した終濃度10 nMの本発明のペプチドあるいは10 nMの本発明のペプチドおよび試験化合物を含むバッファー500 μlを添加する。以降、0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー (pH7.4) を反応用バッファーと呼ぶ。３７℃で６０分間インキュベートした後に、反応液400 μlをシンチレーターに加え、反応液中に遊離した [^{3}H] アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。本発明のペプチドの非添加反応バッファーによる培地中の [^{3}H] アラキドン酸代謝物の量を０％とし、10 nMの本発明のペプチドを添加したときの培地中の [^{3}H] アラキドン酸代謝物の量を１００％として試験化合物の本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に対する影響を算出する。アラキドン酸代謝物産生活性が例えば５０％以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

（５）本発明のタンパク質発現細胞を、本発明のペプチドにより刺激することによって細胞内のＣａ$^{2+}$イオン濃度が上昇する。これを利用することによって本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に対する試験化合物の影響を調べることができる。具体的には、後述の実施例３（３－５）および実施例５（５－３－４）に準じた方法で調べることができる。

本発明のタンパク質発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーグラス上に播き、２日後、培養液を4 mM Fura-2 AM（同仁化学研究所）を懸濁したＨＢＳＳに置換し、室温で２時間３０分おく。ＨＢＳＳで洗浄した後、キュベットにカバーグラスをセットし、蛍光測定器で、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を加えたときの励起波長３４０ｎｍ及び３８０ｎｍでの５０５ｎｍの蛍光強度の比の上昇を測定する。このとき、本発明のペプチドを単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって生じる蛍光強度の変化を測定することにより本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に対して影響を与える化合物のスクリーニング

を行なうことができる。

また、以下のようにＦＬＩＰＲ（モレキュラーデバイス社製）を使うこともできる。すなわち、細胞懸濁液にFluo-3 AM（同仁化学研究所製）を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、９６穴プレートに細胞を播く。ＦＬＩＰＲ装置にセットし、Fura-2の場合と同様に本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を加え、本発明のペプチドを単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって観測される蛍光強度が変化することを測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に対して影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。

これらにおいて、本発明のペプチドによる蛍光強度の上昇を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみの添加による蛍光強度の上昇を観察することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

本発明のタンパク質発現細胞に、細胞内Ｃａ$^{2+}$イオンの上昇によって発光するようなタンパク質の遺伝子（例、aequorinなど）を共発現させておき、細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度の上昇によって、当該遺伝子（例、aequorinなど）がＣａ$^{2+}$結合型となり発光することを利用して、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を加え、本発明のペプチドを単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって観測される発光強度が変化することを測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に対して影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。方法は、蛍光物質を取り込ませないこと以外は上記と同様である。

（６）受容体を発現する細胞に受容体アゴニストを添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度が上昇することが知られている。本発明のペプチドによって生じる本発明のタンパク質細胞におけるこの反応を観察することにより本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。２４穴プレートに播いて１日目の細胞にmyo-[2-^{3}H] inositol（2.5マイクロCi/well）を添加した培地中で１日培養した細胞を、よく洗浄後、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した後、１０％過塩素酸

を加え反応を止める。1.5 M KOH、60mM HEPES溶液で中和し、0.5mlのAG1x8樹脂（Bio-Rad）を詰めたカラムに通し、5mM Na_2BO_3 60mM $HCOONH_4$で洗浄した後、１M $HCOONH_4$、0.1M HCOOHで溶出した放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。本発明のペプチドの非添加反応バッファーによる培地中の放射活性を０％とし、本発明のペプチドを添加したときの培地中の放射活性を１００％として試験化合物の本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に対する影響を算出する。イノシトール三リン酸産生活性が例えば５０％以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみの添加によるイノシトール三リン酸産生上昇を観察することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

（７）ＴＲＥ（TPA response element）を含むＤＮＡを、ピッカジーン・ベイシックベクターまたはピッカジーン・エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））のルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、これをＴＲＥ－レポーター遺伝子ベクターとする。ＴＲＥ－レポーター遺伝子ベクターをトランスフェクションした細胞において、細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度上昇を伴う刺激は、ＴＲＥを介したルシフェラーゼ遺伝子発現とそれに引き続くルシフェラーゼタンパク質の産生を誘導する。つまり、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、ＴＲＥ－レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のカルシウムイオン量の変動を検出することができる。ＴＲＥ－レポーター遺伝子ベクターを本発明のタンパク質発現細胞にトランスフェクトした細胞を利用した本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の具体的なスクリーニング法を以下に記す。

ＴＲＥ－レポーター遺伝子を導入した本発明のタンパク質発現細胞を２４穴プレートに5x10^3 cell/wellで播種し、４８時間培養する。細胞を0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄した後、10 nMの本発明のペプチドあるいは10 nMの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、３７℃で６０分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の

影響は、ルシフェラーゼによる発光量を本発明のペプチドを単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、本発明のペプチドの投与により細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度の上昇によって発光量が増加するが、この増加を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、本発明のペプチドと同様な発光量の増加を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ以外に例えばアルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼあるいはβ－ガラクトシダーゼを用いることもできる。これらのレポーター遺伝子の遺伝子産物の酵素活性は以下のように市販の測定キットを用いて容易に測定することができる。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530によって、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chrolamphenicol Acetyltransferase Assay Kitによって、β－ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEによって測定することができる。

（８）本発明のペプチドに応答した本発明のタンパク質発現細胞はＭＡＰキナーゼ活性化によって増殖が観察される。この増殖をＭＡＰキナーゼ活性、チミジン取り込み、細胞数測定（ＭＴＴなど）によって測定することができる。これを利用して本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。

ＭＡＰキナーゼ活性は、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を細胞に添加した後、細胞溶解液から抗ＭＡＰキナーゼ抗体を用いた免疫沈降によってＭＡＰキナーゼ分画を得た後、例えば和光純薬製MAP Kinase Assay Kitとγ－[^{32}P]-ATPを使用して容易に測定できる。チミジン取り込み活性は、本発明のタンパク質発現細胞を播き、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した後、[methyl-^{3}H]-チミジンを加え、その後、細胞内に取り込まれた標識チミジンの放射活性を細胞を溶解して液体シンチレーションカウンターで計数することによって測定することができる。

本発明のタンパク質発現細胞の増殖は、発現細胞を播き、本発明のペプチドある

いは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した後にMTT（3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide）を添加し、細胞内に取り込まれてＭＴＴが変化したＭＴＴホルマザンを塩酸酸性としたイソプロパノールで細胞を溶解した後、５７０ｎｍの吸収を測定することによっても測定できる。

本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の、標識チミジン取り込み活性を利用した具体的なスクリーニング法を以下に記す。

本発明のタンパク質発現細胞を２４穴プレートにウェル当たり５０００個まき一日間培養する。次に血清を含まない培地で２日間培養し、細胞を飢餓状態にする。本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を細胞に添加して２４時間培養した後、[methyl-^{3}H]-チミジンをウェル当たり０．０１５ＭＢｑ添加し６時間培養する。細胞をＰＢＳで洗った後、メタノールを添加して１０分間放置する。次に５％トリクロロ酢酸を添加して１５分間放置後、固定された細胞を蒸留水で４回洗う。０．３Ｎ水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の影響は、チミジン取り込みによる放射活性の上昇を本発明のペプチドを単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、本発明のペプチドの投与による放射活性の増加を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、本発明のペプチドと同様な放射活性の増加を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

（９）本発明のタンパク質発現細胞に本発明のペプチドを添加すると、Ｋチャンネルが活性化し、細胞内にあるK^{+}イオンが、細胞外に流出する。K^{+}イオンと同族元素であるRb^{+}イオンは、K^{+}イオンと区別無くＫチャンネルを通って細胞外に流出するので、細胞に標識Rb（[^{86}Rb]）を添加して取り込ませておいた後、本発明のペプチドの刺激によって流出する[^{86}Rb]の流れを測定することで本発明のペプチドの作用を測定できる。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の、[^{86}Rb]流出活性を利用した具体的なスクリーニング法を以下に記す。

２４穴にまいて２日後の本発明のタンパク質発現細胞を１mCi/mlの^{86}RbClを含む培地中で２時間保温する。培地をよく洗浄し、外液中の^{86}RbClを完全に除く。本発明の

ペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を細胞に添加して３０分後の外液を回収し、γカウンターで放射活性を測定する。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の影響は、[^{86}Rb] 流出による放射活性の上昇を本発明のペプチドを単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、本発明のペプチドの投与による放射活性の上昇を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、本発明のペプチドと同様な放射活性の上昇を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

（１０）本発明のタンパク質発現細胞が本発明のペプチドに反応して変化する細胞外のｐＨ（acidification rate）をCytosensor装置（モレキュラーデバイス社）を使用して測定することによって、本発明のペプチドの活性を測定することができる。Cytosensor装置を利用した、細胞外ｐＨ変化の測定をすることによる本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の具体的なスクリーニング法を以下に記す。

本発明のタンパク質発現細胞をCytosensor装置用のカプセル内で終夜培養し、装置のチャンバーにセットして細胞外ｐＨが安定するまで約2時間0.1% BSAを含むRPMI 1640培地（モレキュラーデバイス社製）を灌流させる。ｐＨが安定した後、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物を含む培地を細胞上に灌流させることによって生じる培地のｐＨ変化を測定する。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の影響は、本発明のタンパク質発現細胞の細胞外ｐＨ変化を本発明のペプチドを単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、本発明のペプチドの投与による細胞外ｐＨ変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、本発明のペプチドと同様な細胞外ｐＨ変化を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

（１１）酵母（Saccharomyces cerevisiae）のhaploid α-mating Type（ＭＡＴα）の性フェロモン受容体Ｓｔｅ２はＧタンパク質Ｇｐａ１とカップルしており、性フェロモンα－mating factorに応答してＭＡＰキナーゼを活性化し、以下、Ｆａｒ１（cell-cycle arrest）および転写活性化因子Ｓｔｅ１２が活性化される。Ｓｔｅ

１２は接合に関与するＦＵＳ１を含む種々のタンパク質の発現を誘導する。一方、制御因子Ｓｓｔ２は以上の過程に抑制的に機能する。この系において、受容体遺伝子を導入した酵母を作製し、受容体アゴニスト刺激によって酵母細胞内のシグナル伝達系を活性化し、その結果生じる増殖などの指標を用いた、受容体アゴニストと受容体との反応の測定系の試みが行なわれている（Pausch, M. H., Trends in Biotechnology, vol. 15, pp. 487-494 (1997)）。このような受容体遺伝子導入酵母の系を利用して本発明のペプチドおよび本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。

ＭＡＴα酵母のＳｔｅ２およびＧｐａ１をコードする遺伝子を除去し、代わりに本発明のタンパク質の遺伝子およびＧｐａ１－Ｇａｉ２融合タンパク質をコードする遺伝子を導入する。Ｆａｒをコードする遺伝子を除去してcell-cycle arrestが生じないようにし、また、Ｓｓｔをコードする遺伝子を除去することによって本発明のペプチドに対する応答の感度を向上させておく。さらに、ＦＵＳ１にヒスチジン生合成遺伝子ＨＩＳ３をつなげたＦＵＳ１－ＨＩＳ３遺伝子を導入する。以上の遺伝子組換え操作は例えば、Priceら（Price, L. A. et al., Molecular and Cellular Biology, vol. 15, pp. 6188-6195 (1995)）の報告に記載の方法において、ソマトスタチン受容体タイプ２（ＳＳＴＲ２）遺伝子を本発明のタンパク質の遺伝子に置き換えて実施することによって容易に行なうことができる。こうして構築された形質変換酵母は本発明のタンパク質のリガンドである本発明のペプチドに高感度で反応し、その結果ＭＡＰキナーゼの活性化が起きてヒスチジン生合成酵素が合成されるようになって、ヒスチジン欠乏培地で生育可能になる。これを利用して、ヒスチジン欠乏培地での酵母の生育を指標として本発明のペプチドによる本発明のタンパク質発現酵母の応答を観察することができる。

上記のようにして作製された形質変換酵母を完全合成培地の液体培地で終夜培養し、2×10^4 cell/mlの濃度でヒスチジンを除去した溶解寒天培地に加え、9x9 cmの角形シャーレに播く。寒天が固化した後、本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドおよび試験化合物をしみこませた滅菌濾紙を寒天表面におき、３０℃で３日間培養する。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の影響は、濾紙の周囲の酵母の生育を本発明のペプチドを単独で投与した場合と比較する

ことによって測定することができる。このとき、本発明のペプチドの投与による酵母の生育を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、本発明のペプチドと同様な酵母の生育を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。また、あらかじめ、寒天培地に本発明のペプチドを添加しておいて滅菌濾紙に試験化合物のみをしみこませて培養し、シャーレ全面での酵母の生育が濾紙の周囲で影響を受けることを観察することによっても本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の影響を調べることができる。

（１２）本発明のタンパク質の遺伝子ＲＮＡをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、本発明のペプチドによって刺激すると細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これを膜電位の変化としてとらえることが出来る（Ｋ$^{+}$イオン濃度勾配に変化がある場合も同様）。本発明のペプチドによって生じる本発明のタンパク質導入アフリカツメガエル卵母細胞におけるこの反応を観察することにより本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。

氷冷して動けなくなった雌のアフリカツメガエルから取り出した、卵母細胞塊を、ＭＢＳ液（88mM NaCl, 1mM KCl, 0.41mM $CaCl_2$, 0.33mM $Ca(NO_3)_2$, 0.82mM $MgSO_4$、2.4mM $NaHCO_3$、10mM HEPES、pH7.4）に溶かしたコラーゲナーゼ（0.5mg/ml）で卵塊がほぐれるまで１９℃、１－６時間、１５０ｒｐｍで処理する。外液をＭＢＳ液に置換することで３度洗浄し、マイクロマニピュレーターでpoly(A)$^{+}$ SLT cRNA (50ng/50nl)をマイクロインジェクションする。本発明のタンパク質 mRNAは、組織や細胞から調製しても、プラスミドからin vitroで転写してもよい。これをＭＢＳ液中で２０℃で３日培養する。これをRinger液を流しているvoltage clamp装置のくぼみに置き、電位固定用ガラス微小電極、電位測定用ガラス微小電極を細胞内に刺入し、(－)極は、細胞外に置く。電位が安定したら、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を含むRinger液を流して電位変化を記録する。本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合を変化させる化合物の影響は、本発明のタンパク質導入アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜電位変化を本発明のペプチドを単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、本

発明のペプチドの投与による細胞膜電位変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し本発明のペプチドと同様な細胞膜電位変化を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

この系において、反応を変化量を増大して測定しやすいように各種のＧタンパク質遺伝子のpoly(A)$^+$ RNAを導入することもできる。またaequorinのようなＣａ$^{2+}$イオン存在下で発光を生じるようなタンパクの遺伝子のpoly(A)$^+$ RNAを共インジェクションすることにより膜電位変化ではなく発光を観察してこの反応を測定することもできる。

本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、本発明のタンパク質を含有する細胞、あるいは本発明のタンパク質を含有する細胞の膜画分、および本発明のペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

１．スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、０．０５％のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径０．４５μｍのフィルターで濾過滅菌し、４℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②本発明のタンパク質の標品

本発明のタンパク質を発現させたＣＨＯ細胞を、１２穴プレートに5×10^5個／穴で継代し、３７℃、５％CO_2、９５％ａｉｒで２日間培養したもの。

③標識リガンド

〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{35}S〕などで標識した本発明のペプチド。

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを４℃あるいは－２０℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて１μＭに希釈する。

④リガンド標準液

本発明のペプチドを０．１％ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むＰＢＳで１

mMとなるように溶解し、－２０℃で保存する。

２．測定法

①１２穴組織培養用プレートにて培養した本発明のタンパク質を発現させた細胞を、測定用緩衝液１ｍｌで２回洗浄した後、４９０μｌの測定用緩衝液を各穴に加える。

②$１０^{-3}$～１０^{-10}Mの試験化合物溶液を５μｌ加えた後、標識した本発明のペプチドを５μｌ加え、室温にて１時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに１０^{-3}Mの本発明のペプチドを５μｌ加えておく。

③反応液を除去し、１ｍｌの洗浄用緩衝液で３回洗浄する。細胞に結合した標識した本発明のペプチドを０．２Ｎ ＮａＯＨ－１％ＳＤＳで溶解し、４ｍｌの液体シンチレーターＡ（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding（ＰＭＢ）を次の式〔数１〕で求める。

〔数１〕

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

ＰＭＢ：Percent Maximum Binding

Ｂ　　：検体を加えた時の値

ＮＳＢ：Non-specific Binding（非特異的結合量）

B_0　　：最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩は、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物であり、具体的には本発明のタンパク質を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる本発明のタンパク質のアゴニスト（ＺＡＱアゴニスト））、あるいは当該刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明のタンパク質のアンタゴニスト（ＺＡＱアンタゴニスト））である。当該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記本発明のタンパク質のアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の（i）または（ii）に従えばよい。

（i）前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、当該化合物が上記した本発明のタンパク質を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のタンパク質のアゴニストであり、当該活性を有しない化合物またはその塩は本発明のタンパク質のアンタゴニストである。

（ii）（a）試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞に接触させ、上記本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質のアゴニストである。

（b）本発明のタンパク質を活性化する化合物（例えば、本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質のアゴニストなど）を本発明のタンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のタンパク質を活性化する化合物および試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明のタンパク質を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明のタンパク質のアンタゴニストである。

当該本発明のタンパク質のアゴニストは、本発明のタンパク質に対する本発明のペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のタンパク質アンタゴニストは、本発明のタンパク質に対する本発明のペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、当該受容体活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

上述のように、本発明のペプチドは腸管の収縮などを制御する活性を有することから、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）などの疾病の治療・予防剤等の医薬として使用することができるため、上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物のうち、本発明のタンパク質のアゴニスト（ＺＡＱアゴニスト）は消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘

、吸収不良性症候群など）などの疾病の治療・予防剤などとして用いることができる。また、本発明のタンパク質のアンタゴニスト（ＺＡＱアンタゴニスト）は消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）などの疾病の治療・予防剤などとして用いることができる。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、２，６－ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、Ｎ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩などがあげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のペプチドを医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、

エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、当該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば哺乳動物（例え

ば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき約０.１から１０００mg、好ましくは約１．０から３００ｍｇ、より好ましくは約３．０から５０ｍｇである。非経口的に投与する場合は、その１回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の消化器疾患患者（体重６０ｋｇとして）への投与においては、ＺＡＱアンタゴニストを一日につき約０．０１から３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１から２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１から１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（３）本発明のペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量等に使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のペプチドとを競合的に反応させ、当該抗体に結合した標識化された本発明のペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法を提供する。

また、本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のペプチドの定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の$F(ab')_2$、Ｆａｂ'、あるいはＦａｂ画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のペプチドの定量法は、特に制限されるべきもので

はなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明のペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質等が用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{125}I〕、〔^{131}I〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕等が用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等が用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等が用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常ペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース等の不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のペプチド量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のペプチドの測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のペプチドのＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリー等に用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体等を用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリー等が好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書等を参照することができる。

例えば、入江　寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）、入江　寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)等を参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のペプチドを感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のペプチドの濃度を定量することによって、（１）本発明のペプチドの濃度の増多が検出された場合、例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）に罹患している、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、（２）本発明のペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）に罹患している、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織等の被検体中に存在する本発明のペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のペプチドの検出、被検細胞内における本発明のペプチドの挙動の分析等のために使用することができる。

（４）遺伝子診断剤

本発明のＤＮＡは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）における本発明のペプチドをコードするＤＮＡま

たはｍＲＮＡの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、当該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの損傷、突然変異あるいは発現低下や、当該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの増加あるいは発現過多等の遺伝子診断剤として有用である。

本発明のＤＮＡを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやＰＣＲ－ＳＳＣＰ法（ゲノミックス（Genomics），第５巻，８７４～８７９頁（１９８９年）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA），第８６巻，２７６６～２７７０頁（１９８９年））、ＤＮＡマイクロアレイ等により実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションやＤＮＡマイクロアレイにより発現低下が検出された場合やＰＣＲ－ＳＳＣＰ法やＤＮＡマイクロアレイによりＤＮＡの突然変異が検出された場合は、例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）に罹患している可能性が高いと診断することができる。

（５）アンチセンスＤＮＡを含有する医薬

本発明のＤＮＡに相補的に結合し、当該ＤＮＡの発現を抑制することができるアンチセンスＤＮＡは、生体内における本発明のペプチドまたは本発明のＤＮＡの機能を抑制することができるので、例えば、本発明のペプチドの発現過多に起因する疾患（例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など））の治療・予防剤として使用することができる。

上記アンチセンスＤＮＡを上記の治療・予防剤として、前記した本発明のＤＮＡを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様に使用することができる。

例えば、当該アンチセンスＤＮＡを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与することができる。当該アンチセンスＤＮＡは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、当該アンチセンスＤＮＡは、組織や細胞における本発明のＤＮＡの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用する

こともできる。

（６）本発明の抗体を含有する医薬

本発明のペプチドの活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、本発明のペプチドの発現過多に起因する疾患（例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など））の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルート等によっても異なるが、例えば、消化器疾患治療の目的で本発明の抗体を１回量として、通常０．０１～２０ｍｇ／ｋｇ体重程度、好ましくは０．１～１０ｍｇ／ｋｇ体重程度、さらに好ましくは０．１～５ｍｇ／ｋｇ体重程度を、１日１～５回程度、好ましくは１日１～３回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包

含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０（polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil）〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤等が例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常５～５００ｍｇ程度、とりわけ注射剤では５～１００ｍｇ程度、その他の剤形では１０～２５０ｍｇ程度の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

（７）本発明のＤＮＡを含有する非ヒト動物の作出

本発明のＤＮＡを用いて、本発明のタンパク質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作出することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のＤＮＡを対象動物に導入させるにあたっては、当該ＤＮＡを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のＤＮＡを導入させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のＤＮＡを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイク

ロインジェクションすることによって本発明のタンパク質等を高産生するＤＮＡ導入動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するＮＧＦ遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のＤＮＡの導入は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。ＤＮＡ導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明のタンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のタンパク質等を含有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のタンパク質等を含有する。

本発明のＤＮＡ導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、当該ＤＮＡ保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的ＤＮＡを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が当該ＤＮＡを含有するように繁殖継代することができる。

本発明のＤＮＡが導入された動物は、本発明のタンパク質等が高発現させられているので、本発明のタンパク質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のＤＮＡ導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のＤＮＡ導入マウスの組織中のＤＮＡもしくはＲＮＡを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のタンパク質が存在する組織を分析することにより、本発明のタンパク質等について分析することができる。本発明のタンパク質等を含有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のタンパク質等を単離精製することも可能である。

（８）本発明のペプチドの用途など

本発明のペプチドおよび配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、本発明のペプチドと配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法は、前記（2）記載の本発明のスクリーニング方法と同様に実施することができる。

本発明のペプチドおよび配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、本発明のペプチドと配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、前記（2）記載の本発明のスクリーニング用キットと同様に実施することができる。

配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩および配列番号：1、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法は、前記（2）記載の本発明のスクリーニング方法と同様に実施することができる。

配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配

列を含有するペプチドまたはその塩および配列番号：１、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、配列番号：３４で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：１、配列番号：３６、配列番号：４０、配列番号：４７、配列番号：４８もしくは配列番号：４９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、前記（２）記載の本発明のスクリーニング用キットと同様に実施することができる。

上記スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩は、前記（２）記載の本発明のスクリーニング方法または本発明のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩と同様に使用することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければＬ体を示すものとする。

ＤＮＡ　：デオキシリボ核酸
ｃＤＮＡ　：相補的デオキシリボ核酸
Ａ　：アデニン
Ｔ　：チミン
Ｇ　：グアニン
Ｃ　：シトシン
Ｙ　：チミンまたはシトシン
Ｎ　：チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
Ｒ　：アデニンまたはグアニン
Ｍ　：シトシンまたはアデニン

Ｗ：チミンまたはアデニン
Ｓ：シトシンまたはグアニン
ＲＮＡ：リボ核酸
ｍＲＮＡ：メッセンジャーリボ核酸
ｄＡＴＰ：デオキシアデノシン三リン酸
ｄＴＴＰ：デオキシチミジン三リン酸
ｄＧＴＰ：デオキシグアノシン三リン酸
ｄＣＴＰ：デオキシシチジン三リン酸
ＡＴＰ：アデノシン三リン酸
ＧｌｙまたはＧ：グリシン
ＡｌａまたはＡ：アラニン
ＶａｌまたはＶ：バリン
ＬｅｕまたはＬ：ロイシン
ＩｌｅまたはＩ：イソロイシン
ＳｅｒまたはＳ：セリン
ＴｈｒまたはＴ：スレオニン
ＣｙｓまたはＣ：システイン
ＭｅｔまたはＭ：メチオニン
ＧｌｕまたはＥ：グルタミン酸
ＡｓｐまたはＤ：アスパラギン酸
ＬｙｓまたはＫ：リジン
ＡｒｇまたはＲ：アルギニン
ＨｉｓまたはＨ：ヒスチジン
ＰｈｅまたはＦ：フェニルアラニン
ＴｙｒまたはＹ：チロシン
ＴｒｐまたはＷ：トリプトファン
ＰｒｏまたはＰ：プロリン
ＡｓｎまたはＮ：アスパラギン
ＧｌｎまたはＱ：グルタミン

ｐＧｌｕ　：ピログルタミン酸
Ｘａａ　：未同定アミノ酸残基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬等を下記の記号で表記する。

Ｍｅ　：メチル基
Ｅｔ　：エチル基
Ｂｕ　：ブチル基
Ｐｈ　：フェニル基
Ａｃ　：アセチル基
ＴＣ　：チアゾリジン－４（Ｒ）－カルボキサミド基
Ｂｏｍ　：ベンジルオキシメチル
Ｂｚｌ　：ベンジル
Ｚ　：ベンジルオキシカルボニル
Ｂｒ－Ｚ　：２－ブロモベンジルオキシカルボニル
Ｃｌ－Ｚ　：２－クロルベンジルオキシカルボニル
$\mathrm{Cl_2Bzl}$　：２，６－ジクロロベンジル
Ｂｏｃ　：t－ブチルオキシカルボニル
ＨＯＢｔ　：１－ヒドロキシベンズトリアゾール
ＨＯＯＢｔ　：３，４－ジヒドロ－３－ヒドロキシ－４－オキソ－１，２，３－ベンゾトリアジン
ＰＡＭ　：フェニルアセトアミドメチル
Ｔｏｓ　：ｐ－トルエンスルフォニル
Ｆｍｏｃ　：Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニル
ＤＮＰ　：ジニトロフェニル
Ｂｕｍ　：ターシャリーブトキシメチル
Ｔｒｔ　：トリチル
Ｂｏｍ　：ベンジルオキシメチル
Ｚ　：ベンジルオキシカルボニル

ＭｅＢｚｌ	：４－メチルベンジル
ＤＣＣ	：N, N'－ジシクロヘキシルカルボジイミド
ＨＯＮＢ	：1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
ＮＭＰ	：Ｎ－メチルピロリドン
ＨＯＮＢ	：Ｎ－ヒドロキシ－５－ノルボルネン－２，３－ジカルボキシイミド
ＮＭＰ	：Ｎ－メチルピロリドン
ＴＦＡ	：トリフルオロ酢酸
ＣＨＡＰＳ	：３－［（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－１－プロパンスルホナート
ＰＭＳＦ	：フェニルメチルスルホニルフルオリド
ＧＤＰ	：グアノシン－５'－二リン酸
Ｆｕｒａ－２ＡＭ	：１－［６－アミノ－２－（５－カルボキシ－２－オキサゾリル）－５－ベンゾフラニロキシ］－２－（２－アミノ－５メチルフェノキシ）－エタン－Ｎ，Ｎ，Ｎ'，Ｎ'－四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル
Ｆｌｕｏ－３ＡＭ	：１－［２－アミノ－５－（２，７－ジクロロ－６－ヒドロキシ－３－オキシ－９－キサンテニル）フェノキシ］－２－（２－アミノ－５－メチルフェノキシ）エタン－Ｎ，Ｎ，Ｎ'，Ｎ'－四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル
ＨＥＰＥＳ	：２－［４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジニル］エタンスルホン酸
ＥＤＴＡ	：エチレンジアミン四酢酸
ＳＤＳ	：ドデシル硫酸ナトリウム
ＢＳＡ	：ウシ血清アルブミン
ＨＢＳＳ	：ハンクス平衡塩液
ＥＩＡ	：エンザイムイムノアッセイ

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：１〕

本発明のヒト脳由来タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２〕

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のヒト脳由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列を示す（ＺＡＱＣ）。

〔配列番号：３〕

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のヒト脳由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列を示す（ＺＡＱＴ）。

〔配列番号：４〕

後述の実施例１で用いられたプライマー１の塩基配列を示す。

〔配列番号：５〕

後述の実施例１で用いられたプライマー２の塩基配列を示す。

〔配列番号：６〕

後述の実施例２で用いられたプライマー３の塩基配列を示す。

〔配列番号：７〕

後述の実施例２で用いられたプライマー４の塩基配列を示す。

〔配列番号：８〕

後述の実施例２で用いられたＺＡＱｐｒｏｂｅの塩基配列を示す。

〔配列番号：９〕

後述の実施例２で用いられたプライマーZAQC Salの塩基配列を示す。

〔配列番号：１０〕

後述の実施例２で用いられたプライマーZAQC Speの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１〕

後述の実施例３（３－８）で精製されたＺＡＱ活性化ペプチドのＮ末端のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：１２〕

後述の実施例４で用いられたプライマーＺＦ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：１３〕

後述の実施例４で用いられたプライマーＺＦ２の塩基配列を示す。

〔配列番号：１４〕

後述の実施例４で用いられたプライマーＺＦ３の塩基配列を示す。

〔配列番号：１５〕

後述の実施例４で得られたヒト型ＺＡＱリガンドペプチドをコードするＤＮＡの３’端塩基配列を示す。

〔配列番号：１６〕

後述の実施例４で用いられたプライマーＺＡＱＬ－ＣＦの塩基配列を示す。

〔配列番号：１７〕

後述の実施例４で用いられたプライマーＺＡＱＬ－ＸＲ１の塩基配列を示す。

〔配列番号：１８〕

後述の実施例４で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：１９〕

後述の実施例４で得られたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：２０〕

ヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２１〕

ヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２２〕

ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２３〕

ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２４〕

配列番号：２８で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡを含有するＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：２５〕

配列番号：２９で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡを含有するＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：２６〕

配列番号：２０で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：２７〕

配列番号：２１で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：２８〕

配列番号：２２で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：２９〕

配列番号：２３で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：３０〕

後述の実施例５（５－１）で用いられたＤＮＡ断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：３１〕

後述の実施例６（６－２）で分析された、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのN末端アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：３２〕

後述の実施例７で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：３３〕

後述の実施例７で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：３４〕

後述の実施例８で精製されたヘビ毒ＭＩＴ１のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：３５〕

ヒト型Ｉ５Ｅ受容体タンパク質をコードするｃＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：３６〕

ヒト型Ｉ５Ｅ受容体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：３７〕

後述の実施例９で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：３８〕

後述の実施例９で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：３９〕

新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ｒＺＡＱ１）をコードするｃＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：４０〕

新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ｒＺＡＱ１）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：４１〕

後述の実施例１０で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：４２〕

後述の実施例１０で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：４３〕

後述の実施例１０で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４４〕

後述の実施例１０で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４５〕

後述の実施例１０で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４６〕

新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ｒＺＡＱ２）をコードするｃＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：４７〕

新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ｒＺＡＱ２）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：４８〕

マウス由来Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ＧＰＲ７３）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：４９〕

マウス由来Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ｍＩ５Ｅ）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：５０〕

マウス由来Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ＧＰＲ７３）をコードするｃＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：５１〕

マウス由来Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ｍＩ５Ｅ）コードするｃＤＮＡの塩基配列を示す。

〔配列番号：５２〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃１の塩基配列を示す。

〔配列番号：５３〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃２の塩基配列を示す。

〔配列番号：５４〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃３の塩基配列を示す。

〔配列番号：５５〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃４の塩基配列を示す。

〔配列番号：５６〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃５の塩基配列を示す。

〔配列番号：５７〕

参考例１で用いられたＤＮＡ断片＃６の塩基配列を示す。

〔配列番号：５８〕

配列番号：２１で表わされるヒト型ＺＡＱリガンドをコードする合成ＤＮＡの塩基配列を示す。

後述の実施例１で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１－ＺＡＱＣは、平成１１年８月２３日から、日本国茨城県つくば市東１－１－１　中央第６　独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧　通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ））に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－６８５５として、平成１１年８月４日から、日本国大阪府大阪市淀川区十三本町２－１７－８５　財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６３０１として寄託されている。

後述の実施例１で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１－ＺＡＱＴは、平成１１年８月２３日から独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧　通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ））に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－６８５６として、平成１１年８月４日から財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６３０２として寄託されている。

後述の実施例４で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITAは、平成１２年７月１３日から独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧　通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ））に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７２１９として、平成１２年５月２６日から財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６４４０として寄託されている。

後述の実施例４で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITGは、平成１２年７月１３日から独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧　通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ））に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７２２０として、平成１２年５月２６日から財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６４４１として寄託されている。

後述の実施例９で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１-ｒＺＡＱ１は、平成１２年８月２１日から独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧　通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ））に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７２７５として、平成１２年８月１日から財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６４５９として寄託されている。

後述の実施例１０で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）ＤＨ１０Ｂ／ｐＣＭＶ－ｒＺＡＱ２は、平成１２年８月２１日から独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（旧　通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ））に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７２７６として、平成１２年８月１日から財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６４６０

として寄託されている。

後述の参考例１で取得されたエシェリヒア・コリ（Escherichia coli）ＭＭ２９４（ＤＥ３）／ｐＴＣｈ１ＺＡＱは、平成１３（２００１）年４月２７日から、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センターに寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７５７１として、平成１３年１月１６日から受託番号ＩＦＯ　１６５２７として財団法人発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託されている。

実施例

以下に実施例および参考例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

実施例１　Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質ＺＡＱをコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定

ヒト脳下垂体ｃＤＮＡ（CLONTECH社）を鋳型とし、２個のプライマー、プライマー１（5'-GTCGACATGGAGACCACCATGGGGTTCATGG-3'；配列番号：４）及びプライマー２（5'-ACTAGTTTATTTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTTC-3'；配列番号：５）を用いてＰＣＲ反応を行った。当該反応における反応液の組成は上記ｃＤＮＡの１０分の１量を鋳型として使用し、Advantage2 Polymerase Mix（CLONTECH社）１／５０量、プライマー１及びプライマー２を各0.2μM、dNTPs 200μM、及び酵素に添付のバッファーを加え、25μlの液量とした。ＰＣＲ反応は、９４℃・２分の後、９４℃・２０秒、７２℃・１００秒のサイクルを３回、９４℃・２０秒、６８℃・１００秒のサイクルを３回、９４℃・２０秒、６４℃・２０秒、６８℃・１００秒のサイクルを３８回繰り返し、最後に６８℃・７分の伸長反応を行った。当該ＰＣＲ反応後の反応産物をＴＡクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌ＤＨ５αに導入し、ｃＤＮＡをもつクローンをアンピシリンを含むＬＢ寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質をコ

ードする２種類のｃＤＮＡ配列ＺＡＱＣ（配列番号：２）及びＺＡＱＴ（配列番号：３）を得た。このｃＤＮＡより導き出されるアミノ酸配列を含有するタンパク質はいずれも同一配列（配列番号：１）を有したためＺＡＱと命名し、配列番号：２で表されるＤＮＡを含有する形質転換体を大腸菌（Escherichia coli）ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１－ＺＡＱＣと、配列番号：３で表されるＤＮＡを含有する形質転換体を大腸菌ＤＨ５α／ｐＣＲ２．１－ＺＡＱＴと命名した。

実施例２　Ｔａｑｍａｎ ＰＣＲによるＺＡＱの発現分布の解析

Ｔａｑｍａｎ ＰＣＲに用いるプライマー及びプローブは、Primer Express ver. 1.0（PEバイオシステムスジャパン）を用いて検索し、プライマー３（5'-TCATGTTGCTCCACTGGAAGG-3'（配列番号:６））、プライマー４（5'-CCAATTGTCTTGAGGTCCAGG-3'（配列番号:７））、ZAQprobe（5'-TTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAG-3'（配列番号:８））を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM（6-carboxyfluorescein）を付加した。

スタンダードＤＮＡとして、後述の実施例３で得られたpAK－ZAQCを鋳型に、プライマーZAQC Sal（5'-GTCGACATGGAGACCACCATGGGGTTCATGG-3'（配列番号:９））およびZAQC Spe（5'-ACTAGTTTATTTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTTC-3'（配列番号:１０））を用いて増幅したＰＣＲ断片を、CHROMA SPIN200（CLONTECH Laboratories, Inc.（CA, USA））を用いて精製し、10^0-10^6コピー/μlに調整して使用した。各組織のｃＤＮＡソースとして、Human Multiple Tissue cDNA Panel IおよびPanel II（CLONTECH Laboratories, Inc.）を使用した。プライマー、プローブ、鋳型に、Taqman Universal PCR Master Mix（PEバイオシステムスジャパン）を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（PEバイオシステムズジャパン）でＰＣＲ反応および解析をおこなった。

結果を図８および表１に示した。主に精巣、ついで肺、脳等の部位でＺＡＱの発現がみられた。

表１

組織	ZAQ（コピー数μｌ）
脳	6.1
心臓	2.9
腎臓	2.8
肝臓	2.6
肺	7.0
膵臓	2.1
胎盤	3.2
骨格筋	2.6
大腸	1.8
卵巣	3.4
白血球	0.0
前立腺	0.7
小腸	2.2
脾臓	2.1
精巣	28.0
胸腺	1.1

実施例３　ＺＡＱを活性化するペプチドの単離

（３－１）牛乳抽出液の調製

市販の低温殺菌牛乳を用いて、以下の操作を行い抽出液を調製した。牛乳2 literを高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて、10,000 rpm、１５分間、４℃で遠心し、得られた上清をガーゼでろ過し、脂質片を取り除いた。上清に最終濃度1 Mになるように酢酸を加え、４℃にて３０分間攪拌し、次いで高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、１５分間遠心し上清をガーゼでろ過し不溶物を除去した。上清に攪拌しながら２倍容のアセトンを加え４℃にて３時間攪拌した。次いで高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、１５分間遠心後、得られた上清をガーゼでろ過し不溶物を除去した。得られた上清をロータリーエバポレーターにかけ、アセトンを除去し、最終的に１３５０ｍｌまで濃縮した。得られた濃縮液を、６７５ｍｌごとに３３８ｍｌのジエチルエーテルと混合し、分液ロート中にて激しく混和し、２相分離後、水相を得た。得られた水相について同じ操作をさらに１回繰り返し、清澄な水相を得た。得られた水相を、ロータリーエバポレーターを用いて８００ｍｌま

で濃縮し、最終的な抽出液を得た。

（３－２）牛乳抽出液のＣ１８逆相クロマトグラフィーによる粗分画

オクタデシル基を固定したシリカゲルを充填したカラムSep-Pak C18（Waters社）１０ｇをメタノールで膨潤後、1 M 酢酸で平衡化した。このカラムに、（３－１）で調製した抽出液（牛乳2 liter分）を添着した。続いて、このカラムに、１００ｍｌの1 M 酢酸を流しゲルを洗浄した。次に、このカラムに２００ｍｌの６０％アセトニトリル/０．１％トリフルオロ酢酸を流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機（12EL；VirTis社）にて凍結乾燥した。

（３－３）牛乳抽出液のスルホプロピルイオン交換クロマトグラフィーによる粗分画

ポリプロピレン製のカラムに100 mM塩酸中で膨潤させたSP Sephadex C-25（Amersham Pharmacia Biotech 社）を、容量が２ｍｌになるよう充填し、蒸留水及び2 M ギ酸アンモニウム(pH 4.0)で洗浄した後、Ｉ液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:25:74）で平衡化した。上記（３－２）で得られた凍結乾燥物をＩ液２０ｍｌに溶解し、SP Sephadex C-25 2 mlにロードした。Ｉ液１０ｍｌで洗浄後、ＩＩ液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:2.5:6.5）、ＩＩＩ液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:1:2）、ＩＶ液（2 M ギ酸アンモニウム：アセトニトリル：水＝1:0.5:0.5）各１０ｍｌで順次溶出した。得られたＩ液からＩＶ液を、それぞれ凍結乾燥機（12EL；VirTis社）にて凍結乾燥した。

（３－４）牛乳抽出液のＴＳＫｇｅｌ ＯＤＳ８０Ｔｓ逆相高速液体クロマトグラフィーによる分画

TSKgel ODS-80Ts逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 25 cm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/Ｂ液（0.1%トリフルオロ酢酸/60%アセトニトリル）容量8.3%を流し、平衡化した。上記（３－３）で得られたＩ液からＩＶ液の凍結乾燥物を、それぞれ1 M 酢酸４ｍｌに溶解しクロマトグラフィー操作に処した。即ち、凍結乾燥物の溶液４ｍｌを当該カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、1分間かけてＡ液容量６７％／Ｂ液容量３３％まで上昇させ、次いで４０分間かけてＡ液

容量６７％／Ｂ液容量３３％からＡ液容量０％／Ｂ液容量１００％まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。

溶出液を、１ｍｌずつフラクション番号をつけて分取し、各フラクション2 μlを150 μl の0.2% Bovine Serum Albumin (BSA) /蒸留水と混合し凍結乾燥した。この乾燥物を後述の（３－５）に記した細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度上昇活性測定用のアッセイ用サンプルとした。

（３－５）ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度上昇活性の測定

ＺＡＱ安定発現細胞株は以下のようにして調製した。すなわち、実施例１で得たDH5α／pCR2.1－ZAQCの１クローンを、アンピシリンを含むＬＢ培地で振とう培養し、プラスミドpCR2.1－ZAQCを得た。これを制限酵素ＳａｌＩおよびＳｐｅＩで処理し、ＺＡＱＣをコードするインサート部分を切り出した。同様に制限酵素ＳａｌＩおよびＳｐｅＩで処理したpAKKO－1.11H (Biochemica et Biophysica Acta 1219 (1994) 251-259) と、当該インサート部分をLigation Express Kit (CLONTECH Laboratories, Inc. (CA, USA)) を用いて連結し、大腸菌ＤＨ１０Ｂにエレクトロポーレーション法にて導入した。得られたクローンの有するプラスミドの構造を、制限酵素処理ならびに配列解析で確認し、正しい構築のものをＣＨＯ細胞発現用プラスミドpAK－ZAQCとして使用した。

このプラスミドpAK－ZAQCをCHO/dhfr$^-$細胞 (American Type Culture Collection) にCellPhect Transfection kit (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いて形質導入することにより取得した。まず、蒸留水120 μlに溶解したプラスミドＤＮＡ ４ μgに対してBuffer A (CellPhect Transfection Kitに添付) 120 μlを添加し、撹拌し、１０分間静置後、Buffer B (CellPhect Transfection Kitに添付) 240 μlを添加し、激しく撹拌し当該ＤＮＡを含有するＤＮＡ－リン酸カルシウム複合体を形成させた。 5 x 10^{5}個のCHO/ dhfr$^-$ 細胞を６０ｍｍシャーレに播き、１０％のウシ胎児血清 (BIO WHITTAKER 社) を含むHam's F-12培地（日水製薬株式会社）中で３７℃、５％炭酸ガス中で１日間培養した後、当該ＤＮＡ－リン酸カルシウム複合体の懸濁液480 μl をシャーレの当該細胞上に滴下させた。これを、３７℃、５％炭酸ガス中にて６時間培養した後、血清を含まないHam's F-12培地で２回細胞を洗浄し、シャーレの当該細胞上に１５％グリセロールを含む緩衝液(140 mM NaCl, 25 mM

HEPES, 1.4 mM Na_2HPO_4, pH7.1) 1.2mlを添加し２分間処理した。これを、再度、血清を含まないHam's F-12培地で２回洗浄した後、１０％のウシ胎児血清を含むHam's F-12培地中で３７℃、５％炭酸ガス中で一晩培養した。当該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、2×10^4 個ずつ6-well plateに植え込み、透析済み１０％ウシ胎児血清（JRH BIOSCIENCES 社）、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液（大日本製薬株式会社）、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含むDulbecco's modified Eagle medium（ＤＭＥＭ）培地（日水製薬株式会社）中にて３７℃、５％炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換ＣＨＯ細胞は当該培地中で生育するが、非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始後２日毎に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始８－１０日後に生育してきた形質転換ＣＨＯ細胞のコロニーを約２１個選んだ。それぞれ選択された細胞からＲＮＡを市販のＲＮＡ単離用キットを用いて回収し、以降公知のＲＴ－ＰＣＲ法によりＺＡＱを高発現するＺＡＱ発現ＣＨＯ細胞Ｂ－１番クローン（以後、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞と略称する）を選別した。

また、対照としてＥＴＡ（エンドセリンＡ受容体）発現ＣＨＯ細胞２４番クローン（以後ＥＴＡ２４細胞と略称する。Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279巻、675-685頁、1996年参照）を用いた。

上記（３－４）で得られたアッセイ用サンプルについて、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞及びＥＴＡ２４細胞における細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性の測定をＦＬＩＰＲ(Molecular Devices社)を用いて行った。ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、ＥＴＡ２４細胞共に１０％透析処理済ウシ胎児血清(以後d FBSとする)を加えたＤＭＥＭで継代培養しているものを用いた。ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、ＥＴＡ２４細胞をそれぞれ15×10^4cells/mlとなるように培地(10% d FBS-DMEM)に懸濁し、ＦＬＩＰＲ用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200 μlずつ植え込み(3.0×10^4cells/200μl/ウェル)、５％ CO_2インキュベーター中にて３７℃で一晩培養した後用いた(以後細胞プレートとする)。H/HBSS（ニッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g 、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理）20 ml、250 mM Probenecid 200 μl、ウシ胎児血清(FBS) 200 μlを混合した。また、Fluo 3-AM（同仁化学研究所

）２バイアル(50 μg)をジメチルスルフォキサイド 40 μl、20% Pluronic acid（Molecular Probes社） 40 μlに溶解し、これを上記H/HBSS−Probenecid−FBS に加え、混和後、８連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100 μlずつ分注し、５％ CO_2インキュベーター中にて３７℃で１時間インキュベートした(色素ローディング)。上記（３−４）で得られたアッセイ用サンプルについて、各フラクションに、2.5 mM Probenecid、0.1% CHAPSを含むH/HBSS 150 μlを加えて希釈し、ＦＬＩＰＲ用９６穴プレート(V-Bottomプレート、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5 mM Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを４回洗浄し、洗浄後100 μlの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをＦＬＩＰＲにセットしアッセイを行った(ＦＬＩＰＲにより、サンプルプレートから50 μlのサンプルが細胞プレートへと移される)。

その結果、上記（３−３）IV液を上記（３−４）逆相高速液体クロマトグラフィー分離して得られたフラクションNo. 53にＺＡＱＣ−Ｂ１細胞に特異的な細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度上昇活性が見られた。

（３−６）ＴＳＫｇｅｌ Ｓｕｐｅｒ−Ｐｈｅｎｙｌ逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、 0.46 cm x 10 cm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（３−４）で得られたフラクションNo. 53についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、フラクションNo. 53の溶液１ｍｌを当該カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、１分間かけてＡ液容量７５％／Ｂ液容量２５％まで上昇させ、次いで７５分間かけてＡ液容量６７％／Ｂ液容量３３％まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。

溶出液を、500 μlずつフラクションNo. をつけて分取した。分取フラクションより各25 μlづつ0.2% BSA 150 μlと混合し凍結乾燥機（12EL； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に、2.5 mM Probenecid、 0.1% CHAPSを含むH/HBSS 150 μl を加えて溶解し、この溶液50 μlを用いて上記（３－５）の試験法により、細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度上昇活性を測定することにより、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、主としてフラクションNo. 103-105に溶出されていることが判明した。

（３－７）μＲＰＣ Ｃ２／Ｃ１８ ＳＴ ４．６／１００逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

μRPC C2/C18 ST 4.6/100逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（Amersham Pharmacia Biotech社、 0.46 cm x 10 cm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでＡ液（ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水）容量９５％/Ｂ液（0.1%ヘプタフルオロ酪酸/100% アセトニトリル）容量５％を流し平衡化した。

上記（３－６）で得られたTSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo. 103-105をそのままμRPC C2/C18 ST 4.6/100逆相カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで１分間でＡ液（0.1% ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水）容量９５％／Ｂ液（0.1% ヘプタフルオロ酪酸/100% アセトニトリル）容量５％からＡ液容量６５％／Ｂ液容量３５％まで急速に上昇させ、これを次に、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、６０分間かけてＡ液容量５０％／Ｂ液容量５０％まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液は、２１０ｎｍの紫外吸収では単一なピークとして検出された。

溶出液を、500 μlずつフラクション番号をつけて分取し、分取フラクションより各10 μlづつを0.2% BSA 150 μlと混合し凍結乾燥機（12EL；VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に、2.5 mM Probenecid、 0.1% CHAPSを含むH/HBSS 75 μlを加えて溶解し、この溶液50 μlを用いて上記（３－５）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo. 82-84に溶出されていることが判明した。この活性ピークは、２１０ｎｍの紫外吸収ピークに完全に一致し、単一ペプチドにまで精製されたものと判断した。

（３－８）精製されたＺＡＱ活性化ペプチドの構造解析

上記（３－７）で得られたＺＡＱ活性化成分について以下の方法で構造決定を実施した。ＺＡＱ活性化成分精製標品を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物を溶媒ＤＭＳＯ（ジメチルサルフォキシド）に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたＮ末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、Ｎ末端のアミノ酸残基から１6番目のアミノ酸残基のうち、１４残基を同定することができた（Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly （配列番号：１１；Xaaは未同定残基））。

実施例４　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのｃＤＮＡのクローニング

実施例３で得られた牛乳から精製されたＺＡＱを活性化するペプチドのＮ末端アミノ酸配列（配列番号:１１）をクエリーとしてデータベースをＢｌａｓｔ検索したところ、配列番号：１１で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列と同等な配列を含むヒトＥＳＴ（Ｘ４０４６７）を見出した。本配列は完全長のオープンリーディング・フレームを有していなかったので、以下にＲＡＣＥ法により未確定部分の配列を明らかにし、引き続いて完全長のオープンリーディング・フレームを有すｃＤＮＡクローンを取得した。

ＥＳＴ（Ｘ４０４６７）の情報よりプライマーＺＦ１（配列番号：１２）、ＺＦ２（配列番号：１３）とＺＦ３（配列番号：１４）を作成し、ヒト精巣Marathon-Ready cDNA （CLONTECH社）を鋳型として以下に記した3'RACE実験を実施した。

ZF1:　5'-GGTGCCACGCGAGTCTCAATCATGCTCC-3'　（配列番号：１２）
ZF2:　5'-GGGGCCTGTGAGCGGGATGTCCAGTGTG-3'　（配列番号：１３）
ZF3:　5'-CTTCTTCAGGAAACGCAAGCACCACACC-3'　（配列番号：１４）

3'RACEのＰＣＲ反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix （CLONTECH社）を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)$_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF1を 1 μl、10 μMプライマーAP1（プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を1 μl、鋳型ｃＤＮＡ（CLONTECH社、ヒト精巣Marathon-Ready cDNA）を5

μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・60秒の初期変性後、94℃・30秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・44分のサイクル反応を25回行った。

続いて、当該ＰＣＲ反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix （CLONTECH社）を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF2を 1 μl、10 μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの）を1 μl、鋳型ＤＮＡ（当該ＰＣＲ反応液５０倍希釈液）を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・60秒の初期変性後、94℃・30秒-72℃・４分のサイクル反応を５回、94℃・30秒-70℃・４分のサイクル反応を５回、94℃・30秒-68℃・44分のサイクル反応を２５回行った。

さらに続いて、当該ＰＣＲ反応の反応液を鋳型として2回目のnested PCRを実施した。反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix （CLONTECH社）を1 μl、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5μg/ml BSA, 0.05%Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μl、10 μMプライマーZF3を 1 μl、10 μMプライマーAP2（プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のものを用いた。）を1 μl、鋳型ＤＮＡ（当該ＰＣＲ反応液50倍希釈液）を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・60秒の初期変性後、94℃・30秒-72℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・4分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・44分のサイクル反応を25回行った。得られたＤＮＡ断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたＤＮＡの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、3'端配列（配列番号：１５）を得た。

配列番号:１５で表わされる塩基配列及びＥＳＴ（Ｘ４０４６７）の情報によりプライマーZAQL-CF（配列番号：１６）及びZAQL-XR1（配列番号：１７）を作成した。ヒト精巣Marathon-Ready cDNA （CLONTECH社）を鋳型としてプライマーZAQL-CF とZ

AQL-XR1を用いてＰＣＲを実施した。

ZAQL-CF: 5'-CCACCATGAGAGGTGCCACG-3'　(配列番号：１６)

ZAQL-XR1: 5'-CTCGAGCTCAGGAAAAGGATGGTG-3'　(配列番号：１７)

ＰＣＲ反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を1 μl、添付の10 x PCR bufferを5 μl、2.5 mM dNTP mixtureを4 μl、10 μMプライマーZAQL-CF及びZAQL-XR1を各2.5 μl、鋳型ＤＮＡを5μl、及び蒸留水を30 μlを混合して作製した。反応条件は95℃･1分の初期変性後、95℃･1分-60℃･1分-72℃･1分のサイクル反応を40回、および72℃･10分の最終伸長反応とした。得られたＤＮＡ断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたＤＮＡ断片の塩基配列をABI 377 DNA sequencerを用いて解読した結果、３７１ｂｐの、それぞれ配列番号：１８および配列番号：１９で表わされる塩基配列を有していることが明らかとなった。配列番号：１８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ断片を有するプラスミドをpHMITAと、配列番号：１９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡ断片を有するプラスミドをpHMITGと命名した。

プラスミドpHMITA及びpHMITGにより大腸菌（Escherichia coli）を形質転換し、それぞれエシェリヒア・コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITAおよびエシェリヒア・コリ（Escherichia coli）TOP10/pHMITGと命名した。

これらのＤＮＡ断片の塩基配列を解析した結果、配列番号：１８で表わされるＤＮＡ断片は、配列番号：２２で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(Aタイプ、105アミノ酸残基)をコードするＤＮＡ（配列番号：２８）を含んでおり、配列番号：１９で表わされるＤＮＡ断片は、配列番号：２３で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド(Gタイプ、１０５アミノ酸残基)をコードするＤＮＡ（配列番号：２９）を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号：２８および配列番号：２９で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号：２８で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡは、配列番号：２０で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド(Aタイプ、８６アミノ酸残基)をコードする２５８塩基対からなるＤＮＡ（配列番号：２６）を含んでおり、配列番号：２９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡは、配列番号

：２１で表わされるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド(Ｇタイプ、８６アミノ酸残基)をコードする２５８塩基対からなるＤＮＡ（配列番号：２７）を含んでいることが明らかとなった。

実施例５　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生（１）

（５－１）ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド哺乳動物細胞発現ベクターの構築

実施例４において取得したプラスミドpHMITGからＥｃｏＲＩ、ＸｈｏＩ制限酵素消化によってヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするｃＤＮＡを含む３８２ｂｐのＤＮＡ断片（配列番号：３０）を切出した。

すなわち、プラスミドpHMITGをＥｃｏＲＩおよびＸｈｏＩで酵素消化し、得られたＤＮＡを１．５％アガロースゲルを用いて電気泳動し、サイバーグリーン染色される約３８２ｂｐのバンドを含むゲル片を剃刀で切り取った。当該ゲル片よりGene Clean spin DNA抽出キット（BIO 101社）を用いてＤＮＡ断片を回収した。得られたＤＮＡ断片をCMV-IEエンハンサーおよびchicken beta-actin promoterを発現プロモーターとする哺乳動物細胞発現ベクターpCAN618（図１１）に対してＥｃｏＲＩ、ＸｈｏＩ制限酵素切断部位に定法に従ってクローニングした。クローニングされたＤＮＡ断片の塩基配列を前述の方法により解読した結果、配列番号：３０で表わされる塩基配列を有していることが確認された。このヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチドをコードするＤＮＡを含有する哺乳動物細胞発現ベクターをpCANZAQLg2と命名した。

（5-2）ＣＯＳ７細胞への発現ベクターの導入

ＣＯＳ７細胞はＡＴＣＣより購入し、ＤＭＥＭ培地（１０％ FBSを加えたもの）を用いて継代培養しているものを用いた。ＤＭＥＭ培地を用いてＣＯＳ７細胞を1.5×10^6cells/dishとなるよう１０ｃｍシャーレにまき、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド（pCANZAQLg2）2μg（2μlのTEバッファーに溶解）にバッファーＥＣ（Effectene transfection reagent、QIAGEN）298μlを加え、さらにEnhancer 16μlを加え、１秒間混和後室温で３分間放置した。さらにEffectene Transfection Reagent 60μlを加え、１０秒間混和後室温で１０分間放置した。前日にまいた細胞の上清を除き、Ｄ

ＭＥＭ培地１０ｍｌで１回洗浄し、ＤＭＥＭ培地を９ｍｌを加えた。プラスミド溶液にＤＭＥＭ培地１ｍｌを加えて混和後細胞に滴下し、全体を混ぜた後３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ＤＭＥＭ培地１０ｍｌで２回洗浄し、ＤＭＥＭ培地１０ｍｌを加え、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。２日後、培養上清を回収した。

（５－３）ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現ＣＯＳ７細胞培養上清からのＺＡＱを活性化するペプチドの部分精製

（５－３－１）ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現ＣＯＳ７細胞培養上清抽出液の調製

ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現ＣＯＳ７細胞培養上清を回収し、以下の操作を行い抽出液を調製した。先ず、細胞培養上清（約18.5ml）に終濃度が1 Mになるように酢酸１．１ｍｌを滴下し、一時間撹拌した。さらにその２倍容量のアセトンを加え、４℃にて３０分間撹拌し、次いで高速遠心機（CR26H、23型ローター：日立株式会社）を用いて15,000 rpm、３０分間遠心し上清を得た。得られた上清をエバポレーターにかけ、アセトンを除去した後、凍結乾燥機（１２ＥＬ； VirTis社）にて凍結乾燥した。

（５－３－２）ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現ＣＯＳ７細胞培養上清のＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ５０ゲルろ過クロマトグラフィー及びＳｅｐＰａｋカラムクロマトグラフィー

上記（５－３－１）で得られた凍結乾燥粉末を１Ｍ酢酸２ｍｌに溶解後、１Ｍ酢酸で平衡化したSephadex G15（直径３cm、35ml、Pharmacia Biotech 社）カラムに吸着させた後、１Ｍ酢酸をカラムに流し、溶出液を５ｍｌづつフラクションNo.をつけて分取し、凍結乾燥機（１２ＥＬ； VirTis社）で凍結乾燥させた。

SepPak C18-5gカラム（10ml）を、メタノールにて膨潤後、0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水を流し、平衡化した。Sephadex G50ゲルろ過クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.1-16の凍結乾燥品をまとめて0.1%トリフルオロ酢酸/蒸留水 3mlに溶解し、SepPak C18-5gカラムに添着した後、0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水 24mlで洗浄後、0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル20mlで溶出した。得られた溶出液をサーバントにかけた。

（５－３－３）Ｓｕｐｅｒ ＯＤＳ逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm）を、40℃にて、流速1 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。（５－３－２）で得られたSepPak C18-5gカラムフラクションをサーバントにかけた後、Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィーに添着し、流速 1ml/minで60分間で Ａ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量100%／Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量0%からＡ液容量0%／Ｂ液容量100%まで直線的グラジエントで上昇させ、溶出液を回収した。

溶出液を、1 mlずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクション全量を凍結乾燥機（１２ＥＬ； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物にH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSAを加えたもの150μlを加えて溶解し、この溶液を用いて下記（５－３－４）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。

（５－３－４）ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度上昇活性の測定

上記（５－３－３）で得られたサンプルについて、実施例３（３－５）で得られたＺＡＱ発現細胞（ＺＡＱＣ－Ｂ１）における細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度上昇活性の測定をＦＬＩＰＲを用いて行った。また、対照としてhOT7T175発現細胞(hOT7T175-16；ＷＯ００／２４８９０に記載)を用いた。

ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、hOT7T175-16細胞共に１０％透析処理済ウシ胎児血清(以後dFBSとする)を加えたＤＭＥＭで継代培養しているものを用いた。ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞、hOT7T175-16細胞をそれぞれ15×10^{4}cells/mlとなるように培地(10%dFBS-DMEM)に懸濁し、ＦＬＩＰＲ用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200μlずつ播き(3.0×10^{4}cells/200μl/ウェル)、５％ CO_2インキュベーター中で３７℃で一晩培養した後、用いた(以後細胞プレートとする)。H/HBSS(HANKS' 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g 、水酸化ナトリウムで pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理) 21ml、250mM Probenecid 210μl、ウシ胎児血清（ＦＢＳ） 210μlを混合した。また、Fluo3-AM 2バイアル(50μg)をジメチルスルフォキサイド 42μl、20% Pluronic acid 42μlに溶解し、これを上記H/HBSS－Probenecid－FBS に加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を除い

た細胞プレートに各ウェル 100μlずつ分注し、５％ CO_2インキュベーター中で３７℃で１時間インキュベートした(色素ローディング)。上記（５－３－３）で得られたアッセイ用サンプルについて、各フラクションにH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSAを加えたもの150μlを加えて溶解し、ＦＬＩＰＲ用96穴プレート(V-Bottomプレート、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5mM Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを４回洗浄し、洗浄後100μlの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをＦＬＩＰＲにセットし、アッセイを行った(ＦＬＩＰＲにより、サンプルプレートから0.05mlのサンプルが細胞プレートへと移される)。フラクションNo.48-68にＺＡＱＣ－Ｂ１細胞特異的な細胞内Ca^{2+}イオン濃度上昇活性が見られた。このことから、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo.48-68に溶出されていることが判明した。

実施例６　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生（２）

（６－１）培養上清の調製

実施例５に記載した方法でＣＯＳ７細胞にヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド（pCANZAQLg2）を導入した。すなわち、ＤＭＥＭ培地を用いてＣＯＳ７細胞を3.0×10^6cells/dishとなるよう15cmシャーレにまき、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ヒト型ＺＡＱリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド（pCANZAQLg2）４μg（４μlのＴＥバッファーに溶解）にバッファーＥＣ（Effectene transfection reagent、QIAGEN）600μlを加え、さらにEnhancer 32μlを加え、１秒間混和後室温で３分間放置した。さらにEffectene Transfection Reagent 120μlを加え、１０秒間混和後室温で１０分間放置した。前日にまいた細胞の上清を除き、ＤＭＥＭ培地１０ｍｌで１回洗浄し、ＤＭＥＭ培地を３０ｍｌを加えた。プラスミド溶液にＤＭＥＭ培地１ｍｌを加えて混和後細胞に滴下し、全体を混ぜた後３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。ＤＭＥＭ培地１０ｍｌで１回洗浄し、ＤＭＥＭ培地２０ｍｌを加え、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した。１日後、培養上清を回収し、さらにＤＭＥＭ培地２０ｍｌを加

え、３７℃、５％ CO_2インキュベーター中で一晩培養した後培養上清を回収した。

（６－２）培養上清からのヒト型ＺＡＱリガンドペプチドの精製

（６－１）に記載した方法で１５ｃｍシャーレ８０枚分の培養上清を回収し、これに酢酸を終濃度１Ｍになるように添加した。１時間攪拌した後、２倍容のアセトンを添加しタンパク質を析出させた。４℃にて３０分間攪拌し、次いで高速遠心機（CR26H、RR10A 型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、３０分間遠心し上清を得た。得られた上清をエバポレーターにかけアセトンを除去し、あらかじめ0.1％トリフルオロ酢酸/蒸留水で平衡化した逆相カラム（Waters社C18、100 g）に流した。0.1％トリフルオロ酢酸/蒸留水 1000ml、次いで0.1％トリフルオロ酢酸/20％アセトニトリル1000mlでカラムを洗浄した後、0.1％トリフルオロ酢酸/60％アセトニトリル1000mlでペプチドを溶出した。得られた溶出液をエバポレーターにかけた後、凍結乾燥器（１２ＥＬ；VirTis社）にて凍結乾燥した。

TSKgel ODS80TM逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、21.5 mm x 30 cm）を、４０℃にて、流速４ｍｌ／ｍｉｎでA液（0.1％トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。得られた凍結乾燥粉末をＡ液に溶解した後、当該ODS80TMカラムに添着し、流速４ｍｌ／ｍｉｎで１２０分間に Ａ液（0.1％トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量６０％／Ｂ液（0.1％トリフルオロ酢酸/60％アセトニトリル）容量４０％からＡ液容量０％／Ｂ液容量１００％まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、８ｍｌずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから50μlを取り凍結乾燥機（１２ＥＬ；VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物にH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2％ BSAを加えたもの200μlを加えて溶解し、この溶液を用いて上記（５－３－４）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo. 32に溶出されていることが判った。

TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 25 cm）を、２５℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでA液（10 mMぎ酸アンモニウム/10％アセトニトリル）を流し、平衡化した。上記フラクションNo.32を当該C

M-2SWカラムに添着し、流速１ｍｌ／ｍｉｎで60分間にＡ液（10 mMぎ酸アンモニウム/10% アセトニトリル）容量１００％／Ｂ液（1000 mMぎ酸アンモニウム/10% アセトニトリル）容量０％からＡ液容量０％／Ｂ液容量１００％まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、１ｍｌずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから1.5 μlを取り、これをH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSA 200μl希釈し、この溶液を用いて上記（５－３－４）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo. 56および57に溶出されていることが判った。

TSKgel Super phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、4.6 mm x 10 cm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。上記フラクション No.56および57を当該Super phenylカラムに添着し、流速１ｍｌ／ｍｉｎで６０分間にＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量７０％／Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量３０％からＡ液容量５０％／Ｂ液容量５０％まで直線的グラジエントで上昇させて、ペプチドを溶出させた。

溶出液を、１ｍｌずつフラクションNo.をつけて分取し、分取フラクションから1.5 μlを取り、これをH/HBSSに2.5mM Probenecid 、0.2% BSA 200μl希釈し、この溶液を用いて上記（５－３－４）の試験法により、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を有する成分、すなわち、ＺＡＱ活性化成分は、フラクションNo. 54、 55および56に溶出されていることが判った。本活性は単一な紫外吸収ピークと一致し、活性成分が単一にまで精製されたものと判断した。

ＺＡＱ活性化成分精製標品中の溶媒を凍結乾燥して除去し、得られた凍結乾燥物を溶媒ＤＭＳＯ（ジメチルサルフォキシド）に溶解した。この溶液の一部（約7.5 pmol）をプロテインシークエンサー（パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC）を用いたＮ末端アミノ酸配列解析に供した。その結果、Ｎ末端のアミノ酸残基から１０番目のアミノ酸残基のうち、９残基を同定することができた（Ala Val I le Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp （配列番号：３１；Xaaは未同定残基））。得られたアミノ酸配列は、予想されるヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのＮ端アミノ酸配列と一致した。また、ＺＡＱ活性化成分精製標品の質量分析を Finnigan LCQ LC/MS装置(Thermoquest, San Jose, CA)を用いて、エレクトロスプレーイオン化法により実施し、分子量が9657.6であることを確認した。これは１０個のシステイン残基がすべてジスルフィド結合を形成した８６残基のヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド（配列番号：２１）の理論値9657.3に良く一致し、ＺＡＱ活性化成分精製標品が、配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を有するヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドを有していることが確認された。

（６－３）精製ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのＺＡＱ活性化作用の測定

上記（６－２）で精製したヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドのＺＡＱＣ－Ｂ１細胞に対する受容体活性化作用を上記（５－３－４）の試験法により測定した。その結果、ＺＡＱ発現ＣＨＯ細胞（ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞）においてヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドは濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起した。EC_{50}値は96 pMで、ヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチドは非常に強いアゴニスト活性を示すことが明らかとなった。結果を図１０に示す。

実施例７　ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生（３）

（７－１）ヒト型ＺＡＱリガンドペプチド安定発現ＣＨＯ細胞株の樹立

実施例４に記載したプラスミドpHMITGを鋳型として下記のプライマー

5’ GTCGACCACCATGAGAGGTGCCACGC 3’　（配列番号：３２）
5’ ACTAGTCGCAGAACTGGTAGGTATGG 3’　（配列番号：３３）

を用いてヒト型ＺＡＱリガンドｃＤＮＡをＰＣＲ増幅し、pCR Blunt IIベクター（Invitrogen社）にクローニングした。得られた正しい配列を有するクローンからインサートｃＤＮＡをＳａｌＩ及びＳｐｅＩ制限酵素を用いて切り出し、pAKKO1.11H発現ベクターに組み込んだ。当該プラスミドを$CHO/dhFr^-$細胞（American Type Culture Collection）に、上記（３－５）に記載したCellPhect Transfection kit（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いた方法に従って形質導入した。形質導入株数クローンから培養上清を回収し、（３－５）に記載した試験方法により、ＺＡＱＣ－Ｂ

１細胞の細胞内Ｃａ$^{2+}$イオン濃度を上昇させるＺＡＱリガンド活性を測定した。これによりＺＡＱリガンドを高発現するＺＡＱＬ－１発現ＣＨＯ細胞クローンNo. 4を選別した。

（７－２）ヒト型ＺＡＱリガンド（ＺＡＱＬ－１）発現ＣＨＯ細胞無血清培養上清の調製

透析済み10％ウシ胎児血清（JRH BIOSCIENCES 社）、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco' s Modified Eagle Medium（ＤＭＥＭ）培地（日水製薬株式会社）でSingle Tray (Nunc社) ４枚コンフルエントまで培養したＺＡＱＬ－１発現ＣＨＯ細胞クローンNo. 4を、トリプシン処理して分散後、遠心して回収した。上記Single Tray 1枚分の細胞を上記培地1.5 Lに懸濁後Cell Factories 10（Nunc社）に植え込み、４基のCell Factories 10について37℃で5％炭酸ガス中にて３日間培養した。培養上清を除いた後、前述のH/HBSS 1 Lで１基のCell Factories 10の細胞を洗浄した。H/HBSSを除いた後、１基のCell Factories 10あたり2 Lの無血清培地（1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco' s Modified Eagle Medium培地）を加えさらに2日間培養した。回収した培養上清を日立高速遠心機で1,000 rpmで１０分間遠心後、ガーゼを用いてろ過し清澄な上清を得た。これに酢酸を最終濃度1 Mになるように添加し以下の操作を行った。

（７－３）ＺＡＱＬ－１発現ＣＨＯ細胞無血清培養上清のオクタドデシル逆相クロマトグラフィーによる粗分画

オクタドデシル基を固定したシリカゲルを充填したPrepC18（Waters社）をメタノールで膨潤後、ガラス製カラムに充填した（50 mm×100 mm）。その後、1 M 酢酸で平衡化したカラムに、（６－２）で調製した抽出液を添着した。次にこのカラムを８００ｍｌの１Ｍ酢酸で洗浄した。次に、このカラムに１０００ｍｌの６０％アセトニトリル／０．１％トリフルオロ酢酸を流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機（12EL ; VirTis社）にて凍結乾燥した。

（７－４）Ｗａｋｏｓｉｌ－ＩＩ ５Ｃ１８ＨＧ Ｐｒｅｐ逆相高速液体クロマトグラフィーによる分離

Wakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（和光純薬、20mm×250mm）を、４０℃にて、流速５ｍｌ／ｍｉｎでＡ液（0.1%トリフルオロ酢酸／蒸留水）容量91.7%/Ｂ液（0.1%トリフルオロ酢酸／６０％アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（７－３）で得られた凍結乾燥物についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物を１Ｍ酢酸３６ｍｌを加えて溶解し遠心後、その内の１／３を当該カラムに添着した後、流速５ｍｌ／ｍｌで、１分間かけてＡ液容量66.7%／Ｂ液容量33.3% まで上昇させ、次いで１２０分間かけてＡ液容量16.7%Ｂ液容量83.3%まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出液を５ｍｌずつフラクション番号をつけて分取した。分取フラクションより各3μlづつ0.2% BSA 150 μl と混合し凍結乾燥機（12EL； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥物に、アッセイバッファー〔H/HBSS（ニッスイハンクス２（日水製薬株式会社） 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g 、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理）に、2.5 mM Probenecid および0.1% CHAPS を添加したもの〕150 μlを加えて溶解し、この溶液50 μl を用いて上記（３－５）の試験法に従い、ＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo.73-75に溶出されていることが判明した。

（７－５）ＴＳＫｇｅｌ ＣＭ－２ＳWイオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分離

TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、7.8×300mm）を25℃にて、流速2 ml/minでＡ液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 299 : 100）容量100%、Ｂ液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 2 : 1）容量0%を流し平衡化した。（７－４）で得られたWakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.73-75を凍結乾燥したものをＡ液4 mlに溶解しTSKgel CM-2SWイオン交換カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで１２０分間かけてＡ液容量２５％／Ｂ液容量７５％ まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を２ｍｌずつフラクション番号をつけて分取し、分取フラクションより各10 μlづつを0.2% BSA 100 μl 混合し凍結乾燥機（12EL； VirTis社）で凍結乾燥させた。この乾燥

物に上記アッセイバッファー100 μl を加えて溶解しこれをさらに同バッファーで１００倍希釈し上記（３－５）の試験法に従い、ＺＡＱ受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱ受容体活性化作用を有する成分はフラクションNo. 95-100に溶出されていることが判明した。

（７－６）ＴＳＫｇｅｌ ＯＤＳ－８０Ｔｓ逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel ODS-80Ts 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6 mm x 100 mm）を、４０℃にて、流速１ｍｌ／ｍｉｎでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。上記（７－５）で得られたフラクションNo. 95-100の凍結乾燥物についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物を1 M酢酸4 mlを加えて溶解し当該カラムに添着した後、流速１ｍｌ／ｍｉｎで、１分間かけてA液容量７５％/Ｂ液容量２５％まで上昇させ、次いで６０分間かけてA液容量２５％Ｂ液容量７５％までＢ液濃度を直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を１ｍｌずつフラクション番号をつけて分取した。（３－５）に記載した方法に従いＺＡＱリガンド活性を測定し、当該活性が単一な紫外吸収ピークと一致するフラクションに溶出されていることを確認した。これよりＺＡＱリガンドが単一に精製されたものと判断した。

（７－７）精製されたＺＡＱリガンドペプチドの構造解析

上記（７－６）で得られたＺＡＱリガンドペプチドについて以下の方法で構造決定を実施した。ＺＡＱ活性化主成分精製標品中の凍結乾燥機（12EL；VirTis社）にて凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物を溶媒DMSO(ジメチルサルフォキシド)に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたN末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、予想されるヒト方ＺＡＱリガンドペプチド成熟体(配列番号：２１)と一致するN端アミノ酸配列を得た。また、Finnigan LCQ LC/MS装置を用いて、エレクトロンスプレーイオン化法により質量分析を行い、分子量が9658.0であると算定した。本測定値はヒト型ＺＡＱリガンド成熟体ペプチド(配列番号：２１)の理論値9657.3にと良く一致し、目的とする配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有するペプ

チドが取得できたことが確認された。

実施例８　ヘビ毒ＭＩＴ１およびヒト型ＺＡＱリガンドとＺＡＱおよびＩ５Ｅとの反応性

（８－１）ヘビ毒ＭＩＴ１の単離

（８－１－１）Ｗａｋｏｓｉｌ－ＩＩ　５Ｃ１８ＨＧ　Ｐｒｅｐ逆相高速液体クロマトグラフィーによる分離

Wakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（和光純薬、20mm×250mm）を、40℃にて、流速5 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。Black Mamba毒液（Sigma社）凍結乾燥品50 mgに1 M AcOH 4 mlを加え溶解し、15,000 rpmで10分間遠心して得られた上清についてクロマトグラフィー操作を行った。サンプルを当該カラムに添着した後、流速5 ml/minで、1分間かけてＡ液容量91.7%/Ｂ液容量8.3% まで上昇させ、次いで120分間かけてＡ液容量33.4%Ｂ液容量66.6%まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出液を20分後から10 mlずつフラクション番号をつけて分取した。各フラクションから1 μlを採取し、前述のアッセイバッファーで10,000倍希釈後、上記（３－５）の試験法に従い、ＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQ-B1受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo. 21-23に溶出されていることが判明した。

（８－１－２）ＴＳＫｇｅｌ　ＣＭ－２ＳＷイオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分離

TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6×250 mm）を25℃にて、流速1 ml/minでＡ液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 299 : 100）容量100%、Ｂ液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 2 : 1）容量0%を流し平衡化した。（７－１）で得られたWakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo. 21-23を凍結乾燥したものをＡ液4 mlに溶解しTSKgel CM-2SWイオン交換カラムに添着した後、流速 1 ml/minで90分間かけてＡ液容量0%／Ｂ液容量100%ま

で直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を1 mlずつフラクション番号をつけて分取した。各フラクションから1 μlを採取し、前述のアッセイバッファーで10,000倍希釈後、上記（３－５）の試験法に従い、 ZAQ-B1受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQ-B1受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo.50-51に溶出されていることが判明した。

（８－１－３）Ｖｙｄａｃ２３８ＴＰ３４１０逆相高速液体クロマトグラフィーによる分離

Vydac238TP3410逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（Vydac、 4.6mm×100mm）を、40℃にて、流速1 ml/minでＡ液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.3%を流し平衡化した。（８－１－２）で得られたTSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo.50-51を直接当該カラムに添着した後、流速1 ml/minで、1分間かけてＡ液容量75%/Ｂ液容量25% まで上昇させ、次いで75分間かけてＡ液容量41.7%Ｂ液容量58.3%まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出液を0.5 mlずつフラクション番号をつけて分取した。各フラクションから1 μlを採取し、前述のアッセイバッファーで10,000倍希釈後、上記（３－５）の試験法により、ＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を測定した。その結果、目的とするＺＡＱ－Ｂ１受容体活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo.108-115に溶出されていることが判明した。

（８－１－４）精製されたヘビ毒ＭＩＴ１の構造解析

上記（８－１－３）で得られたヘビ毒ＭＩＴ１について以下の方法で構造決定を実施した。 精製したＭＩＴ１を凍結乾燥機（12EL；VirTis社）にて凍結乾燥した。得られたペプチド凍結乾燥物を溶媒ＤＭＳＯ（ジメチルサルフォキシド）に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC)を用いたＮ末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、予想されるヘビ毒ＭＩＴ１（配列番号：３４）と一致するＮ端アミノ酸配列を得た。また、Finnigan LCQ LC/MS装置を用いて、エレクトロンスプレーイオン化法により質量分析を行い、分子量が8506.8であると算定した。本測定値はヘビ毒ＭＩＴ１の理論値8506.4に良く一致し、目的とする配列番号：３４で表わされるアミノ酸配

列を含有するペプチドが取得できたことが確認された。

（８－２）Ｉ５Ｅ安定発現細胞株の樹立

ヒト型Ｉ５Ｅ受容体ｃＤＮＡ（配列番号：３５）を公知のＰＣＲ法によりクローニングし、pAKKO1.11H発現ベクターに組み込んだ。当該発現ベクターを（３－５）に記載した方法に従い、CHO/dhFr$^-$細胞（American Type Culture Collection）に形質導入した。培養開始10-14日後に生育してきた形質転換ＣＨＯ細胞のコロニーを約20個選んだ。 選択した細胞を3×10^{4}個/wellで96穴プレートに植え込み、（３－５）に記載した試験法に従い、ＭＩＴ１に対する反応性を検討した。反応性の良いＩ５Ｅ発現ＣＨＯ細胞4番クローン（Ｉ５Ｅ－４細胞と略称する）を選別した。配列番号：３５で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：３６に示す。

（８－３）ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドおよびＭＩＴ１のＺＡＱ受容体およびＩ５Ｅ受容体活性化作用の測定

実施例７に記載した方法で精製したヒト型ＺＡＱリガンドペプチド、及び上記（８－１）に記載した方法で精製したヘビ毒ＭＩＴ１について、それらのＺＡＱ受容体活性化作用、及びＩ５Ｅ受容体活性化作用を（３－５）に記載した方法に従い測定した。結果を〔図１２〕および〔図１３〕に示す。

その結果、ヒト型ＺＡＱリガンドペプチドおよびヘビ毒ＭＩＴ１は濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起した。ヘビ毒ＭＩＴ１のＺＡＱ受容体活性化作用はヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのそれに比べて１０倍強かった。また、ヘビ毒ＭＩＴ１のヒト型Ｉ５Ｅ受容体活性化作用はヒト型ＺＡＱリガンドペプチドのそれに比べて１００倍程度強いものであった。

実施例９　ラット脳ｃＤＮＡ由来新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ｒＺＡＱ１）をコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定

ラット全脳ｃＤＮＡライブラリー（CLONTECH社）を鋳型とし、２種類のプライマー（配列番号：３７および配列番号：３８）を用いてＰＣＲ反応を行った。当該反応における反応液の組成は上記ｃＤＮＡを10分の１量鋳型として使用し、 Advantage-2 cDNApolymerase Mix （CLONTECH社）1/50量、プライマー各0.2μM、dNTPs 200μM、および酵素に添付のバッファーを加え、25μlの液量とした。ＰＣＲ反応は、

①94℃·2分の後、②94℃·20秒、72℃・１分30秒のサイクルを3回、③94℃·20秒、68℃・１分30秒のサイクルを3回、④94℃·20秒、62℃·20秒、68℃１分のサイクルを36回繰り返し、最後に68℃・7分の伸長反応を行った。当該ＰＣＲ反応後の反応産物をTOPO－ＴＡクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1－TOPO（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、ｃＤＮＡを持つクローンを，アンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質をコードするｃＤＮＡ（配列番号：３９）を得た。当該ｃＤＮＡの塩基配列から導き出されるアミノ酸配列（配列番号：４０）には、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と83.7％の相同性がみられた。このアミノ酸配列を含有する新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質をrZAQ1と命名した。また配列番号：３９で表わされる塩基配列を含有するＤＮＡを含有する形質転換体（大腸菌）については、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）DH5α/pCR2.1－rZAQ1と命名した。

実施例１０　ラット脳ｃＤＮＡ由来　新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質（ｒＺＡＱ２）をコードするｃＤＮＡのクローニングと塩基配列の決定

rZAQ2をコードするクローンは、genetrapper法で取得した。すなわち、プローブ（配列番号：４１および配列番号：４２）をビオチン化したのち、一本鎖にしたラット全脳ｃＤＮＡライブラリー（GIBCO－BRL社）とハイブリダイゼーションし、得られた一本鎖遺伝子をプライマー（配列番号：４３および配列番号：４４）を用いて二本鎖に修復した。この遺伝子を大腸菌DH10Bにエレクトロポーレーションし、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を得た。さらに、プローブ（配列番号：４１）とプライマー（配列番号：４５）を用いたコロニーＰＣＲで、目的とする塩基配列をコードするクローンを選択した。このクローンの塩基配列から予測されるＯＲＦ（open reading frame）の塩基配列（配列番号：４６）より導き出されるアミノ酸配列（配列番号：４７）は、rZAQ1と80.6％の相同性がみられた。このアミノ酸配列を含有する新規Ｇタンパク質共役型受容体タンパク質をrZAQ2と命名した。また、このgenetrapper法で取得した形質転換体（大腸菌）を、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）DH10B/pCMV-rZAQ2と命名した。

実施例１１　モルモット回腸摘出標本を用いた収縮実験

モルモット（std:Hartley、7-8週令、雄性、体重450 g程度）の頸動脈をはさみで切断し失血死させた後、開腹し回腸を摘出した。回腸を、95% O_2-5% CO_2ガスを吹き込んだTyrode液（組成：138 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.8 mM $CaCl_2$、0.5 mM $MgCl_2$、1.1 mM NaH_2PO_4、11.9 mM $NaHCO_3$、5.6 mM glucose）を入れたガラスシャーレに入れ、手術用はさみとピンセットを用いて回腸に付着している脂肪片や結合組織を除去した後に、約1.5 cmの長さに切り標本として用いた。この標本を３７℃に暖めた上記Tyrode液を満たしたオーガンバス（２０ｍｌ）中に懸垂し、０．５ｇの負荷をかけて３０分以上かけて安定させた。

回腸標本の収縮反応は、ＮＥＣ三栄のAMPLIFIER CASE 7747を用いて測定した。

アセチルコリン1 μMを投与し最大収縮反応を測定した後に、参考例１の方法に準じて得られたヒト型ＺＡＱリガンドペプチド（ZAQL-1）または上記（８－１－３）で得られたヘビ毒ＭＩＴ１を累積投与して収縮反応を測定した。ＺＡＱＬ－１とＭＩＴ１の希釈には0.05% bovine serum albuminを含む生理食塩水を用いた。

結果を〔図１４〕に示す。ＺＡＱＬ－１およびＭＩＴ１により惹起される収縮反応は、アセチルコリン１ μMにより惹起される収縮反応を１００％としてパーセントで示した。

その結果、ＺＡＱＬ－１とＭＩＴ１は容量依存的に強力な収縮反応を惹起した。容量反応曲線から算出したＺＡＱＬ－１およびＭＩＴ１のEC_{50}値は、それぞれ1.79 nMおよび0.40 nMであった。

実施例１２　ＺＡＱおよびＩ５Ｅ発現ＣＨＯ細胞膜画分を用いたバインディングアッセイ

（１２－１）^{125}Ｉ－ＭＩＴ１の調製

[^{125}I]-Bolton-Hunter Reagent (monoiodinated、37 MBq、NEN社NEX120)に含まれるベンゼンを窒素ガスで留去後、ＤＭＳＯ20 μlを添加し、ピペッティングして乾固物を溶解した。ここにBorateバッファー（組成；100 mM H_3BO_3、pH 8.5）で希釈した4 nmol のＭＩＴ１を含む溶液80 μlを添加し、直ちに混合後、室温で2時間

インキュベーションした。その後、10%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸200 μlを添加し、ＨＰＬＣ分離用サンプルとした。これを室温にて流速1 ml/minでＡ液（10%アセトニトリル／0.1%トリフルオロ酢酸）容量１００％／Ｂ液（0.1% トリフルオロ酢酸/40% アセトニトリル）容量０％を流し、平衡化したTSKgel Super-ODS逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm）に添着した後、流速１ｍｌ／ｍｌで、１分間かけてＡ液容量60％／Ｂ液容量40％まで上昇させ、次いで60分間かけてＡ液容量40％／Ｂ液容量60％まで、Ｂ液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出される[^{125}I]-Bolton-Hunter Reagentが導入されたＭＩＴ１を手動で分取し、バッファー（組成；20 mM Tris、1 mM EDTA、0.2 % BSA、0.1% CHAPS、0.03% NaN_3、pH 7.4）で希釈し分注後、－80℃で保存した。

（１２－２）細胞膜画分の調製

細胞膜画分は、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、279巻、675-685頁、1996年記載の方法に従い調製した。10％透析済みウシ胎児血清（JRH BIOSCIENCES 社）、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、および100 μg/ml Streptomycinを含む Dulbecco's modified Eagle medium (ＤＭＥＭ) 培地（日水製薬株式会社）中、37℃、5％炭酸ガス中にて受容体発現ＣＨＯ細胞、すなわち、ZAQC-B1細胞またはＩ５Ｅ－４細胞をSingletray (Nunc) にて培養した。80-90％の細胞密度になったところで培養上清を捨て、トレイに1 g/l EDTAを含むPBS（宝酒造）を30 ml加え、細胞を洗浄後、上清を捨て上記PBS-EDTAを30 ml添加し、室温で放置した。トレイをしんとうし、細胞をトレイからはがし、細胞懸濁液を回収した。さらにトレイに上記PBS-EDTA 10 mlを再度加えて洗浄し、トレイに残った細胞をはがし、最初に得られた細胞懸濁液細胞と混合した。混合した細胞懸濁液を、高速遠心機（TOMY RL601）を用いて1,000 rpmで５分間遠心した。上清を捨て、沈殿した細胞を－８０℃で保存した。この沈殿（Singletray 1枚分）に破砕用バッファー（組成；10 mM $NaHCO_3$、5 mM EDTA、0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)、10 μg/ml pepstatin-A、20 μg/ml leupeptin、10 μg/ml E-64）４ｍｌを添加し、ピペッティングして沈殿を懸濁し、次いでポリトロン（刃型PTA7）を用いて、目盛り設定４、２０秒間、３回の条件で破砕した。次に、日立高速冷却遠心

機CR26HでNo. 26ローターを用い、2,500 rpmで10分間遠心した。得られた上清をさらに超遠心機（日立工機SCP70H）でSRP70ATローターを用いて、35,000 rpmで１時間遠心した。得られた沈殿にバインディングアッセイバッファー（組成；20 mM Tris、1 mM EDTA、0.5 mM PMSF、10 μg/ml pepstatin-A、40 μg/ml leupeptin、10μg/ml E-64、0.03% NaN_3、pH 7.4）5 mlを添加し、懸濁後、Cell Strainer（FALCON 2350）でろ過し、ＺＡＱＣ－Ｂ１細胞膜画分（すなわち、ＺＡＱ膜画分）あるいはＩ５Ｅ－４細胞膜画分（すなわち、Ｉ５Ｅ膜画分）を得た。得られたそれぞれの膜画分のタンパク濃度をCoomassie Protein Assay Reagent（PIERCE）を用いて測定後、100 μlずつ分注し、－８０℃で保存した。

（１２－３）バインディングアッセイ

0.1% BSAを含む上記（１２－２）記載のバインディングアッセイバッファーにて、ＺＡＱ膜画分は10 μg/mlに、Ｉ５Ｅ膜画分は20 μg/mlにそれぞれ希釈し、200 μlずつチューブ（FALCON 2053）に分注した。この希釈した各膜画分に、試験化合物2 μl および10 nM ^{125}I-MIT1 2 μlを添加し、２５℃で１時間インキュベーションした。試験化合物としては、参考例１の方法に準じて得られたヒト型ＺＡＱリガンドペプチド（ＺＡＱＬ－１）または上記（８－１－３）で得られたヘビ毒ＭＩＴ１（非標識ＭＩＴ１）を用いた。

次に、反応液にろ過バッファー（組成；20 mM Tris、EDTA、0.1% BSA、0.05% CHAPS、0.03% NaN_3、pH 7.4）1.5 mlを加え、バッファー（組成；20 mM Tris、0.3% polyethyleneimine、pH 7.4）で予め処理したガラス繊維ろ紙GF/F（Whatman）で直ちにろ過し、反応チューブに再度ろ過バッファー1.5 mlを添加し同様にろ過した。ガラス繊維ろ紙の放射活性を、γカウンター（COBRA、Packard）を用いて測定し、^{125}I-MIT1 結合量を測定した。試験化合物として非標識ＭＩＴ１（終濃度1 μM）を用いた場合の ^{125}I-MIT1結合量を非特異的結合量(NSB)、試験化合物を全く添加しない場合の^{125}I-MIT1結合量を総結合量(TB)と定め、最大特異的結合量(TB-NSB)を算出した。また、試験化合物を添加した際に得られた結合量(B)についても、特異的結合量(B-NSB)を算出し、最大特異的結合量に対するパーセント｛ %SPB=(B-NSB)/(TB-NSB) × 100 ｝を以って試験化合物存在下の結合量を表わした。

ＺＡＱ膜画分を用いた結果を〔図１５〕に、Ｉ５Ｅ膜画分を用いた結果を〔図１

6〕に示す。

このバインディングアッセイ系で算出した非標識MIT1のIC_{50}値は、38 pM（ＺＡＱ膜画分）、32 pM（Ｉ５Ｅ膜画分）であった。ZAQL-1のIC_{50}値は、35 nM（ZAQ膜画分）、93 nM（Ｉ５Ｅ膜画分）であった。

参考例１　大腸菌でのヒトＺＡＱリガンド（配列番号：２１）の製造

（参考例１－１）　大腸菌でのヒトＺＡＱリガンド発現プラスミドの構築

(a) 以下に示す６種のＤＮＡ断片＃１～＃６を用いて、ＺＡＱリガンドの構造ＤＮＡを調製した。

＃1：

5'-TATGGCGGTGATTACCGGTGCGTGCGAACGTGATGTGCAGTGCGGTGCGGGTACCTGCTGCGCGATTAGCCTGTGGCTGCGTGGTCTG-3'　（配列番号：５２）、

＃2:

5'-CGTATGTGCACCCCGCTGGGTCGTGAAGGTGAAGAATGCCATCCGGGTAGCCATAAAGTGCCGTTCTTCCGTAAACGTAAACATCATACCTG-3'　（配列番号：５３）、

＃3:

5'-CCCGTGCCTGCCGAACCTGCTGTGCAGCCGTTTCCCGGATGGTCGTTATCGTTGCAGCATGGATCTGAAAAACATTAACTTTTAGG-3'　（配列番号：５４）、

＃4:

5'-CACATACGCAGACCACGCAGCCACAGGCTAATCGCGCAGCAGGTACCCGCACCGCACTGCACATCACGTTCGCACGCACCGGTAATCACCGCCA-3'　（配列番号：５５）、

＃5:

5'-AGGCACGGGCAGGTATGATGTTTACGTTTACGGAAGAACGGCACTTTATGGCTACCCGGATGGCATTCTTCACCTTCACGACCCAGCGGGGTG-3'　（配列番号：５６）、

＃6:

5'-GATCCCTAAAAGTTAATGTTTTTCAGATCCATGCTGCAACGATAACGACCATCCGGGAAACGGCTGCACAGCAGGTTCGGC-3'　（配列番号：５７）。

(b) ＤＮＡオリゴマーのリン酸化

５’側になるべき上記＃１および＃６を除いた４種のＤＮＡオリゴマー（＃２～＃５）各々を、２５μlのリン酸化反応液〔ＤＮＡオリゴマー１０μg，５０mM Tris－ＨＣl，pH７．６，１０mM $MgCl_2$，１mMスペルミジン，１０mM ジチオスレイトール（以後ＤＴＴと略記），０．１mg／mlウシ血清アルブミン（以後ＢＳＡと略記），１mM ＡＴＰ，１０ユニットＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）〕中で３７℃・１時間反応させ、各オリゴマーの５’末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、２倍量のエタノールを加え、－７０℃に冷却した後、遠心でＤＮＡを沈殿させた。

(c) ＤＮＡフラグメントの連結

上記（ｂ）で得られたＤＮＡフラグメントと上記＃1および＃６を合わせ、１２０μｌとした。この混合液を９０℃で１０分間保持した後、室温まで徐冷しアニーリングを行った後、TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液３０μｌにキットに付属のＩＩ液３０μｌを加え、よく混合した後、キットに付属のＩ液６０μｌを加え、３７℃・１時間反応させ、ライゲーションを行った。その後、フェノール処理を行ない、水層を回収して２倍量のエタノールを加え、－７０℃に冷却した後、遠心でＤＮＡを沈殿させた。この様にして得られたＤＮＡフラグメントをＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）によるリン酸化を行った後、以下の工程(ｄ)に供した。

(d) ＺＡＱリガンド発現ベクターの構築

発現用ベクターとしてはｐＴＣＩＩ（特開2000-178297号に記載）をＮｄｅＩおよびＢａｍＨＩ（宝酒造）で３７℃・２時間消化した後、１％アガロースゲル電気泳動により４．３kbのＤＮＡ断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、２５μｌのＴＥ緩衝液に溶解した。このｐＴＣＩＩのＮｄｅＩ、ＢａｍＨＩ断片と上記により調製したＺＡＱリガンドの構造遺伝子（配列番号：５８）をTaKaRa DNA ligation kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を１０μl用いて大腸菌ＪＭ１０９コンピテントセル（東洋紡）を形質転換し、１０μｇ／ｍｌのテトラサイクリンを含むＬＢ寒天培地上に播き、３７℃で１晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニー選んだ。この形質転換体を

ＬＢ培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドｐＴＣｈ１ＺＡＱを調製した。このＺＡＱリガンドＤＮＡの塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル３７７ＤＮＡシーケンサーを用いて確認した。プラスミドｐＴＣｈ１ＺＡＱを大腸菌（Escherichia coli）ＭＭ２９４（ＤＥ３）に形質転換し、ＺＡＱリガンド発現株Escherichia coli MM294(DE3)/ pTCh1ZAQを得た。

（参考例１－２）ＺＡＱリガンドの製造

上記のEscherichia coli MM294(DE3)/ pTCh1ZAQを５．０ｍｇ／Ｌのテトラサイクリンを含むＬＢ培地・１Ｌ（１％ペプトン、０．５％酵母エキス、０．５％塩化ナトリウム）を用いて２Ｌ容フラスコ中で３７℃、８時間振とう培養した。得られた培養液を１９Ｌの主発酵培地（１．６８％リン酸１水素ナトリウム、０．３％リン酸２水素カリウム、０．１％塩化アンモニウム、０．０５％塩化ナトリウム、０．０５％硫酸マグネシウム、０．０２％消泡剤、０．０００２５％硫酸第１鉄、０．０００５％塩酸チアミン、１．５％ブドウ糖、１．５％ハイケースアミノ）を仕込んだ５０Ｌ容発酵槽へ移植して、３０℃で通気撹拌を開始した。培養液の濁度が５００クレット単位になったところで、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシドの最終濃度が１２ｍｇ／Ｌになるように添加し、さらに４時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約２００ｇの湿菌体を取得し、－８０℃で保存した。

この形質転換大腸菌ＭＭ２９４（ＤＥ３）／ｐＴＣｈ１ＺＡＱは、受託番号ＩＦＯ　１６５２７として財団法人発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託されている。

（参考例１－３）ＺＡＱリガンドの活性化

参考例（１－２）で得られた菌体２００ｇに、２００mMトリス／ＨＣｌ、７Ｍグアニジン塩酸塩（ｐＨ８．０）４００ｍｌを加えて菌体を溶解した後、遠心分離（１００００ｒｐｍ、１時間）を行った。上澄液に０．４Mアルギニン、５０mMトリス／ＨＣｌ、０．２mM　ＧＳＳＧ、１mM　ＧＳＨ（ｐＨ８．０）１０リットルを加えて、４℃で一晩活性化を行った。

（参考例１－４）ＺＡＱリガンドの精製

参考例（１－３）で活性化の終了した再生液をｐＨ６．０に調整し、５０mMリ

ン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で平衡化したＳＰ－セファロースカラム（１１．３ｃｍ×１５ｃｍ）に吸着させた後、６００mM ＮａＣｌ／５０mMリン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で溶出し、ＺＡＱリガンドを含むフラクションをプールした。この画分を５０mM リン酸緩衝液（ｐＨ６．０）で平衡化したＣＭ－５ＰＷ（２１．５㎜×１５０㎜L）に通液し、吸着、洗浄した後、０－１００％Ｂ（Ｂ＝５０mM リン酸緩衝液＋１Ｍ NaCl、pH６．０５）の段階勾配（６０分）で溶出を行いＺＡＱリガンド画分（溶出時間約４０分）を得た。この画分を、さらに0.１％トリフルオロ酢酸で平衡化したＣ４Ｐ－５０（２１.５㎜ＩＤ×３００㎜L、昭和電工）に通液し、吸着、洗浄した後、２５－５０％Ｂ（Ｂ：８０％アセトニトリル／0.１％トリフルオロ酢酸）の段階勾配（６０分）で溶出を行い、ＺＡＱリガンド画分（溶出時間約４０分）をプールした後、凍結乾燥を行い、ＺＡＱリガンド凍結乾燥粉末約８０㎎を得た。

（参考例１－５）ＺＡＱリガンドの特徴決定

(a) ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

参考例（１－４）で得られたＺＡＱリガンドを１００mM ＤＴＴを添加したＳample buffer [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)] に懸濁し、９５℃で１分間加熱した後、マルチゲル１５／２５（第一化学薬品）で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー（Coomassie brilliant blue）で染色した結果、実施例５で得られたＣＯＳ７細胞由来の組換え型ＺＡＱリガンド標品と同じ位置に、単一のタンパク質バンドが認められた。このことから、参考例（１－４）で得られた大腸菌由来の組換え型ＺＡＱリガンド標品は極めて高純度であり、ＣＯＳ７細胞から調製した組換え型ＺＡＱリガンドと分子量的に同一であることが分かった。

(b) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計（日立Ｌ－８５００Ａ Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。その結果、ＺＡＱリガンド（配列番号：２１で表されるアミノ酸配列からなるペプチド）のＤＮＡの塩基配列から推定されるアミノ酸組成と一致した（表２）。

表２

アミノ酸	１モル当たりの残 基 数	ＺＡＱリガンドの塩基配列から予測される値
Ａｓｘ	５．７	６
Ｔｈｒ １）	３．３	４
Ｓｅｒ １）	３．４	４
Ｇｌｘ	５．０	５
Ｐｒｏ	５．６	６
Ｇｌｙ	７．７	８
Ａｌａ	３．９	４
Ｃｙｓ ２）	Ｎ．Ｄ．	１０
Ｖａｌ	２．９	３
Ｍｅｔ	１．９	２
Ｉｌｅ	２．６	３
Ｌｅｕ	８	８
Ｔｙｒ	１．０	１
Ｐｈｅ	３．７	４
Ｈｉｓ	３．８	４
Ｌｙｓ	３．８	４
Ａｒｇ	８．５	９
Ｔｒｐ	０．９．	１

酸加水分解（６Ｎ　ＨＣｌ－１％フェノール、１１０℃、２４及び４８時間加水分解の平均値）

１）０時間に外挿した値

２）未検出

(c) Ｎ末端アミノ酸配列分析

Ｎ末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（ＰＥアプライドバイオシステムズ　モデル４９２）を用いて決定した。その結果、得られたＺＡＱリガンドのＤＮＡの塩基配列から推定されたＺＡＱリガンドのＮ末端アミノ酸配列と一致した（表３）。

表３

残基 Ｎｏ．	検出された PTH-アミノ酸[1)] (pmol)	ＺＡＱリガンドの塩基配列から予測されるアミノ酸
1	Ａｌａ(99)	Ａｌａ
2	Ｖａｌ(100)	Ｖａｌ
3	Ｉｌｅ(91)	Ｉｌｅ
4	Ｔｈｒ(57)	Ｔｈｒ
5	Ｇｌｙ(70)	Ｇｌｙ
6	Ａｌａ(89)	Ａｌａ
7	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
8	Ｇｌｕ(60)	Ｇｌｕ
9	Ａｒｇ(49)	Ａｒｇ
１０	Ａｓｐ(54)	Ａｓｐ
１１	Ｖａｌ(79)	Ｖａｌ
１２	Ｇｌｎ(67)	Ｇｌｎ
１３	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
１４	Ｇｌｙ(54)	Ｇｌｙ
１５	Ａｌａ(65)	Ａｌａ
１６	Ｇｌｙ(47)	Ｇｌｙ

１７	Ｔｈｒ(32)	Ｔｈｒ
１８	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
１９	Ｎ．Ｄ．	Ｃｙｓ
２０	Ａｌａ(36)	Ａｌａ

１）フェニールチオヒダントイン１５０ｐｍｏｌを用いて分析を行った。
Ｎ．Ｄ．は未検出を示す。

（d）Ｃ末端アミノ酸分析

Ｃ末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立Ｌ－８５００Ａ　Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。得られたＺＡＱリガンドはＤＮＡの塩基配列から推定されたＣ末端アミノ酸と一致した（表４）。

表４

Ｃ末端アミノ酸	回収率（％）
Ｐｈｅ	４９．８

気相ヒドラジン分解法（１００℃，３．５時間）

（e）質量分析

質量分析をnanoESIイオン源を装着したLCQイオントラップ質量分析計（サーモクエスト社製）を用いて行った。その結果、分子量9657.55±0.89が得られ、配列番号：２１の、しかも配列番号：２１が含有する１０残基のＣｙｓが５対のジスルフィド結合を形成したＺＡＱリガンドの理論分子量(9657.3)と良く一致していた。

（参考例１－６）ＺＡＱリガンドの活性測定（ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ｃａイオン濃度上昇活性の測定）

参考例（１－４）で得られた純化された大腸菌由来の組換え型ＺＡＱリガンド標品を実施例５の方法を用いて、活性測定（ＦＬＩＰＲを用いた細胞内Ｃａイオン濃

度上昇活性の測定）を行った。その結果、実施例５で得られたＣＯＳ７細胞由来の組換え型標品（ＺＡＱリガンドの精製品）と同等の活性を有していた。

産業上の利用可能性

本発明のペプチド、本発明のペプチドをコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）および本発明のペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、①本発明のペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤、②本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング、③本発明のペプチドまたはその塩の定量、④遺伝子診断剤、⑤アンチセンスＤＮＡを含有する医薬、⑥本発明の抗体を含有する医薬、⑦本発明のＤＮＡを含有する非ヒト動物の作出、⑧構造的に類似したリガンド・受容体との比較にもとづいたドラッグデザイン、などの実施のために有用である。

請求の範囲

１．配列番号：２０または配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩。

２．配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項１記載のペプチドまたはその塩。

３．配列番号：２０で表わされるアミノ酸配列を含有する請求項１記載のペプチドまたはその塩。

４．配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列を含有する請求項１記載のペプチドまたはその塩。

５．配列番号：２２または配列番号：２３で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項１記載のペプチドまたはその塩。

６．請求項１記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

７．ＤＮＡである請求項６記載のポリヌクレオチド。

８．配列番号：２６または配列番号：２７で表される塩基配列を含有する請求項７記載のＤＮＡ。

９．配列番号：２８または配列番号：２９で表される塩基配列を含有する請求項７記載のＤＮＡ。

１０．請求項６記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

１１．請求項１０記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

１２．請求項１１記載の形質転換体を培養し、請求項１記載のペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項１記載のペプチドまたはその塩の製造法。

１３．請求項１記載のペプチドまたはその塩に対する抗体。

１４．請求項１記載のペプチドまたはその塩および配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合

物またはその塩のスクリーニング方法。

１５．請求項１記載のペプチドまたはその塩および配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

１６．請求項１記載のペプチドまたはその塩および配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

１７．請求項１記載のペプチドまたはその塩および配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

１８．請求項１４記載のスクリーニング方法または請求項１６記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

１９．請求項１５記載のスクリーニング方法または請求項１７記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

２０．請求項１８または１９記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

２１．消化器疾患の予防･治療剤である請求項２０記載の医薬。

２２．請求項１記載のペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

２３．消化器疾患の予防･治療剤である請求項２２記載の医薬。

２４．哺乳動物に対して、請求項１４記載のスクリーニング方法または請求項１６記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする消化器疾患の予防・治療方法。

２５．哺乳動物に対して、請求項１５記載のスクリーニング方法または請求項１７記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする消化器疾患の予防・治療方法。

２６．消化器疾患の予防・治療剤を製造するための請求項１４記載のスクリーニング方法または請求項１６記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用。

２７．消化器疾患の予防・治療剤を製造するための請求項１５記載のスクリーニング方法または請求項１７記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項１記載のペプチドまたはその塩と配列番号：３６で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用。

図 1

```
        10        20        30        40        50        60
ATGGAGACCACCATGGGGTTCATGGATGACAATGCCACCAACACTTCCACCAGCTTCCTT
M  E  T  T  M  G  F  M  D  D  N  A  T  N  T  S  T  S  F  L

        70        80        90       100       110       120
TCTGTGCTCAACCCTCATGGAGCCCATGCCACTTCCTTCCCATTCAACTTCAGCTACAGC
S  V  L  N  P  H  G  A  H  A  T  S  F  P  F  N  F  S  Y  S

       130       140       150       160       170       180
GACTATGATATGCCTTTGGATGAAGATGAGGATGTGACCAATTCCAGGACGTTCTTTGCT
D  Y  D  M  P  L  D  E  D  E  D  V  T  N  S  R  T  F  F  A

       190       200       210       220       230       240
GCCAAGATTGTCATTGGGATGGCCCTGGTGGGCATCATGCTGGTCTGCGGCATTGGAAAC
A  K  I  V  I  G  M  A  L  V  G  I  M  L  V  C  G  I  G  N

       250       260       270       280       290       300
TTCATCTTTATCGCTGCCCTGGTCCGCTACAAGAAACTGCGCAACCTCACCAACCTGCTC
F  I  F  I  A  A  L  V  R  Y  K  K  L  R  N  L  T  N  L  L

       310       320       330       340       350       360
ATCGCCAACCTGGCCATCTCTGACTTCCTGGTGGCCATTGTCTGCTGCCCCTTTGAGATG
I  A  N  L  A  I  S  D  F  L  V  A  I  V  C  C  P  F  E  M

       370       380       390       400       410       420
GACTACTATGTGGTGCGCCAGCTCTCCTGGGAGCACGGCCACGTCCTGTGCACCTCTGTC
D  Y  Y  V  V  R  Q  L  S  W  E  H  G  H  V  L  C  T  S  V
```

図 2

```
        430       440       450       460       470       480
AACTACCTGCGCACTGTCTCTCTCTATGTCTCCACCAATGCCCTGCTGGCCATCGCCATT
N  Y  L  R  T  V  S  L  Y  V  S  T  N  A  L  L  A  I  A  I

        490       500       510       520       530       540
GACAGGTATCTGGCTATTGTCCATCCGCTGAGACCACGGATGAAGTGCCAAACAGCCACT
D  R  Y  L  A  I  V  H  P  L  R  P  R  M  K  C  Q  T  A  T

        550       560       570       580       590       600
GGCCTGATTGCCTTGGTGTGGACGGTGTCCATCCTGATCGCCATCCCTTCCGCCTACTTC
G  L  I  A  L  V  W  T  V  S  I  L  I  A  I  P  S  A  Y  F

        610       620       630       640       650       660
ACCACCGAGACGGTCCTCGTCATTGTCAAGAGCCAGGAAAAGATCTTCTGCGGCCAGATC
T  T  E  T  V  L  V  I  V  K  S  Q  E  K  I  F  C  G  Q  I

        670       680       690       700       710       720
TGGCCTGTGGACCAGCAGCTCTACTACAAGTCCTACTTCCTCTTTATCTTTGGCATAGAA
W  P  V  D  Q  Q  L  Y  Y  K  S  Y  F  L  F  I  F  G  I  E

        730       740       750       760       770       780
TTCGTGGGCCCCGTGGTCACCATGACCCTGTGCTATGCCAGGATCTCCCGGGAGCTCTGG
F  V  G  P  V  V  T  M  T  L  C  Y  A  R  I  S  R  E  L  W

        790       800       810       820       830       840
TTCAAGGCGGTCCCTGGATTCCAGACAGAGCAGATCCGCAAGAGGCTGCGCTGCCGCAGG
F  K  A  V  P  G  F  Q  T  E  Q  I  R  K  R  L  R  C  R  R

        850       860       870       880       890       900
AAGACGGTCCTGGTGCTCATGTGCATCCTCACCGCCTACGTGCTATGCTGGGCGCCCTTC
K  T  V  L  V  L  M  C  I  L  T  A  Y  V  L  C  W  A  P  F
```

図 3

```
        910       920       930       940       950       960
TACGGCTTCACCATCGTGCGCGACTTCTTCCCCACCGTGTTCGTGAAGGAGAAGCACTAC
Y  G  F  T  I  V  R  D  F  F  P  T  V  F  V  K  E  K  H  Y

        970       980       990      1000      1010      1020
CTCACTGCCTTCTACATCGTCGAGTGCATCGCCATGAGCAACAGCATGATCAACACTCTG
L  T  A  F  Y  I  V  E  C  I  A  M  S  N  S  M  I  N  T  L

       1030      1040      1050      1060      1070      1080
TGCTTCGTGACCGTCAAGAACGACACCGTCAAGTACTTCAAAAAGATCATGTTGCTCCAC
C  F  V  T  V  K  N  D  T  V  K  Y  F  K  K  I  M  L  L  H

       1090      1100      1110      1120      1130      1140
TGGAAGGCTTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAGACCTGGACCTCAAGACAATTGGG
W  K  A  S  Y  N  G  G  K  S  S  A  D  L  D  L  K  T  I  G

       1150      1160      1170      1180      1190
ATGCCTGCCACCGAAGAGGTGGACTGCATCAGACTAAAATAA
M  P  A  T  E  E  V  D  C  I  R  L  K  *
```

図 4

```
         10         20         30         40         50         60
ATGGAGACCACCATGGGGTTCATGGATGACAATGCCACCAACACTTCCACCAGCTTCCTT
 M  E  T  T  M  G  F  M  D  D  N  A  T  N  T  S  T  S  F  L

         70         80         90        100        110        120
TCTGTGCTCAACCCTCATGGAGCCCATGCCACTTCCTTCCCATTCAACTTCAGCTACAGC
 S  V  L  N  P  H  G  A  H  A  T  S  F  P  F  N  F  S  Y  S

        130        140        150        160        170        180
GACTATGATATGCCTTTGGATGAAGATGAGGATGTGACCAATTCCAGGACGTTCTTTGCT
 D  Y  D  M  P  L  D  E  D  E  D  V  T  N  S  R  T  F  F  A

        190        200        210        220        230        240
GCCAAGATTGTCATTGGGATGGCCCTGGTGGGCATCATGCTGGTCTGCGGCATTGGAAAC
 A  K  I  V  I  G  M  A  L  V  G  I  M  L  V  C  G  I  G  N

        250        260        270        280        290        300
TTCATCTTTATCGCTGCCCTGGTCCGCTACAAGAAACTGCGCAACCTCACCAACCTGCTC
 F  I  F  I  A  A  L  V  R  Y  K  K  L  R  N  L  T  N  L  L

        310        320        330        340        350        360
ATCGCCAACCTGGCCATCTCTGACTTCCTGGTGGCCATTGTCTGCTGCCCCTTTGAGATG
 I  A  N  L  A  I  S  D  F  L  V  A  I  V  C  C  P  F  E  M

        370        380        390        400        410        420
GACTACTATGTGGTGCGCCAGCTCTCCTGGGAGCACGGCCACGTCCTGTGCACCTCTGTC
 D  Y  Y  V  V  R  Q  L  S  W  E  H  G  H  V  L  C  T  S  V
```

図 5

```
         430       440       450       460       470       480
AACTACCTGCGCACTGTCTCTCTCTATGTCTCCACCAATGCCCTGCTGGCCATCGCCATT
N  Y  L  R  T  V  S  L  Y  V  S  T  N  A  L  L  A  I  A  I

         490       500       510       520       530       540
GACAGGTATCTGGCTATTGTCCATCCGCTGAGACCACGGATGAAGTGCCAAACAGCCACT
D  R  Y  L  A  I  V  H  P  L  R  P  R  M  K  C  Q  T  A  T

         550       560       570       580       590       600
GGCCTGATTGCCTTGGTGTGGACGGTGTCCATCCTGATCGCCATCCCTTCCGCCTACTTC
G  L  I  A  L  V  W  T  V  S  I  L  I  A  I  P  S  A  Y  F

         610       620       630       640       650       660
ACCACCGAGACGGTCCTCGTCATTGTCAAGAGCCAGGAAAAGATCTTCTGCGGCCAGATC
T  T  E  T  V  L  V  I  V  K  S  Q  E  K  I  F  C  G  Q  I

         670       680       690       700       710       720
TGGCCTGTGGACCAGCAGCTCTACTACAAGTCCTACTTCCTCTTTATCTTTGGCATAGAA
W  P  V  D  Q  Q  L  Y  Y  K  S  Y  F  L  F  I  F  G  I  E

         730       740       750       760       770       780
TTCGTGGGCCCCGTGGTCACCATGACCCTGTGCTATGCCAGGATCTCCCGGGAGCTCTGG
F  V  G  P  V  V  T  M  T  L  C  Y  A  R  I  S  R  E  L  W

         790       800       810       820       830       840
TTCAAGGCGGTCCCTGGATTCCAGACAGAGCAGATCCGCAAGAGGCTGCGCTGCCGCAGG
F  K  A  V  P  G  F  Q  T  E  Q  I  R  K  R  L  R  C  R  R

         850       860       870       880       890       900
AAGACGGTCCTGGTGCTCATGTGCATCCTCACCGCCTACGTGCTATGCTGGGCGCCCTTC
K  T  V  L  V  L  M  C  I  L  T  A  Y  V  L  C  W  A  P  F
```

図 6

```
       910       920       930       940       950       960
TACGGCTTCACCATCGTGCGCGACTTCTTCCCCACCGTGTTTGTGAAGGAGAAGCACTAC
Y  G  F  T  I  V  R  D  F  F  P  T  V  F  V  K  E  K  H  Y

       970       980       990      1000      1010      1020
CTCACTGCCTTCTACATCGTCGAGTGCATCGCCATGAGCAACAGCATGATCAACACTCTG
L  T  A  F  Y  I  V  E  C  I  A  M  S  N  S  M  I  N  T  L

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
TGCTTCGTGACCGTCAAGAACGACACCGTCAAGTACTTCAAAAAGATCATGTTGCTCCAC
C  F  V  T  V  K  N  D  T  V  K  Y  F  K  K  I  M  L  L  H

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
TGGAAGGCTTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAGACCTGGACCTCAAGACAATTGGG
W  K  A  S  Y  N  G  G  K  S  S  A  D  L  D  L  K  T  I  G

      1150      1160      1170      1180      1190
ATGCCTGCCACCGAAGAGGTGGACTGCATCAGACTAAAATAA
M  P  A  T  E  E  V  D  C  I  R  L  K  *
```

図 7

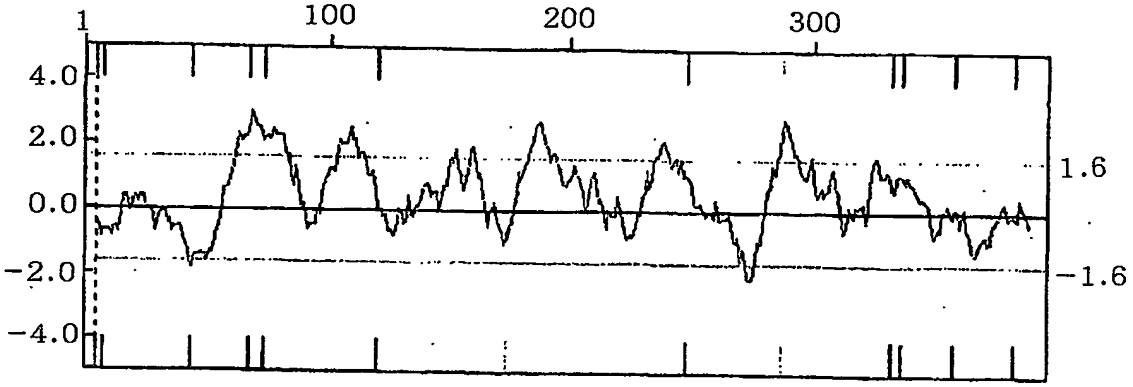


図 8

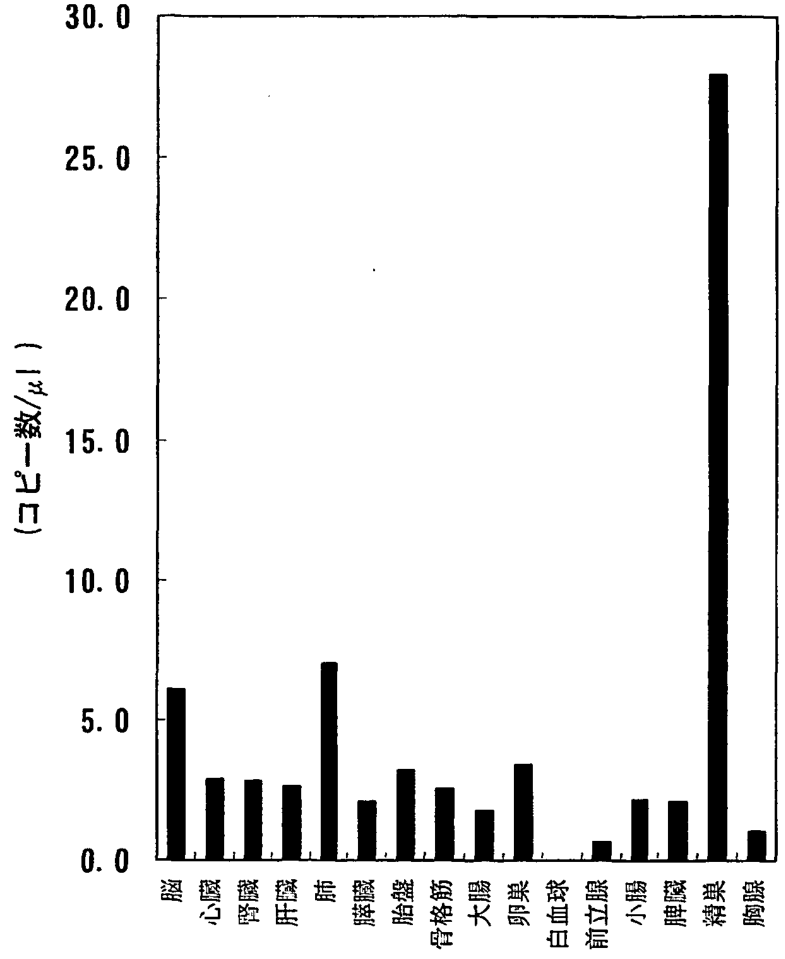

30. 0
25. 0
20. 0
15. 0
10. 0
5. 0
0. 0
(コピー数/μl)
脳
心臓
腎臓
肝臓
肺
膵臓
胎盤
骨格筋
大腸
卵巣
白血球
前立腺
小腸
脾臓
精巣
胸腺

図 9

MIT1	AVITGACERD LQCGKGTCCA VSLWIKSVRV CTPVGTSGED CHPASHKIPF
Human (A type)	AVITGACERD VQCGAGTCCA ISLWLRGLRM CTPLGREGEE CHPGSHKIPF
Human (G type)	AVITGACERD VQCGAGTCCA ISLWLRGLRM CTPLGREGEE CHPGSHKVPF

MIT1	SGQRMHHTCP CAPNLACVQT SPKKFKCLSK
Human (A type)	FRKRKHHTCP CLPNLLCSRF PDGRYRCSMD LKNINF
Human (G type)	FRKRKHHTCP CLPNLLCSRF PDGRYRCSMD LKNINF

図 １０

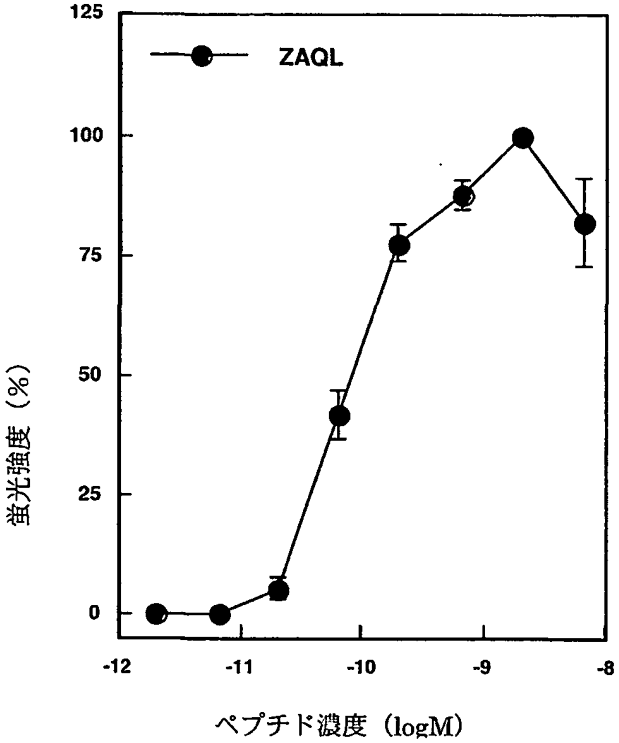


図 11

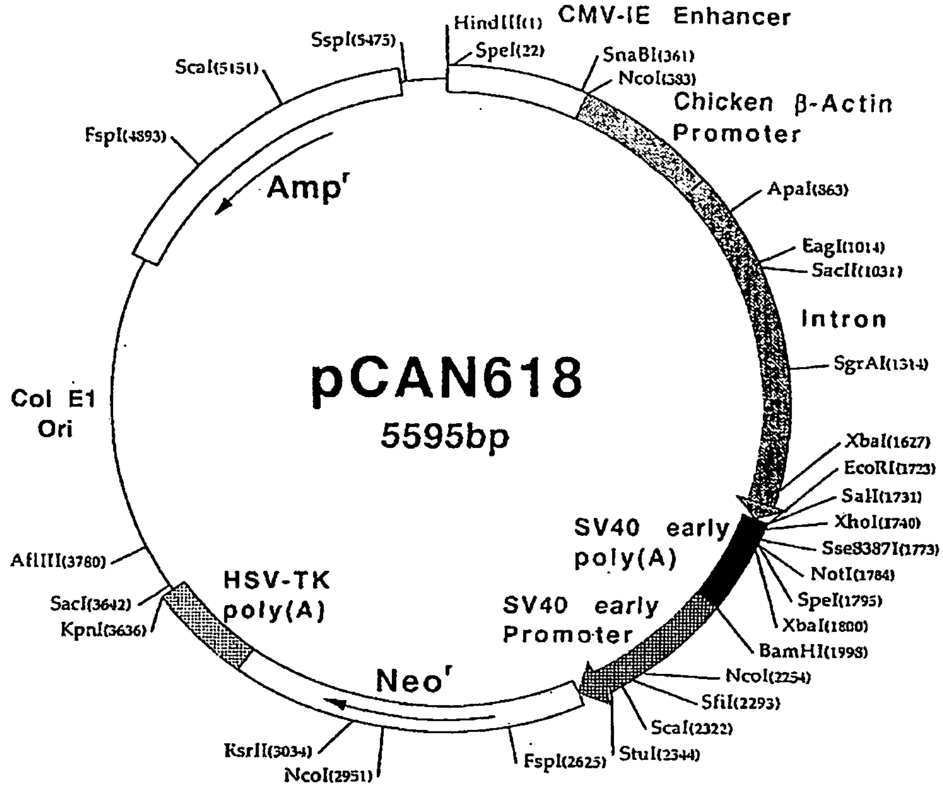

pCAN618
5595bp
HindIII(1)
CMV-IE Enhancer
SpeI(22)
SnaBI(361)
NcoI(383)
Chicken β-Actin Promoter
ApaI(863)
EagI(1014)
SacII(1031)
Intron
SgrAI(1314)
XbaI(1627)
EcoRI(1723)
SalI(1731)
XhoI(1740)
Sse8387I(1773)
NotI(1784)
SpeI(1795)
XbaI(1800)
SV40 early poly(A)
BamHI(1998)
SV40 early Promoter
NcoI(2254)
SfiI(2293)
ScaI(2322)
StuI(2344)
FspI(2625)
Neo^r
NcoI(2951)
KsrII(3034)
HSV-TK poly(A)
KpnI(3636)
SacI(3642)
AflIII(3780)
Col E1 Ori
FspI(4893)
Amp^r
ScaI(5151)
SspI(5475)

図 １２

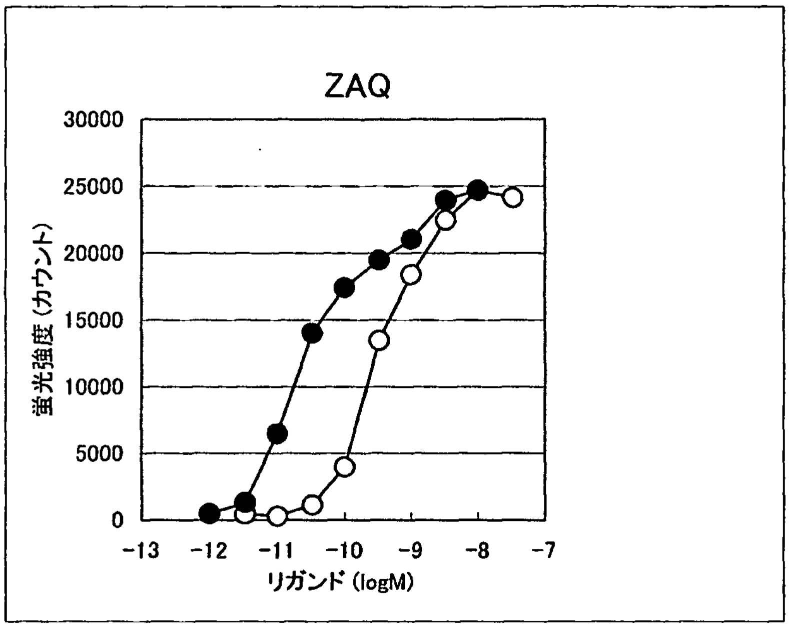

ZAQ
蛍光強度（カウント）
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
−13
−12
−11
−10
−9
−8
−7
リガンド (logM)

図１３

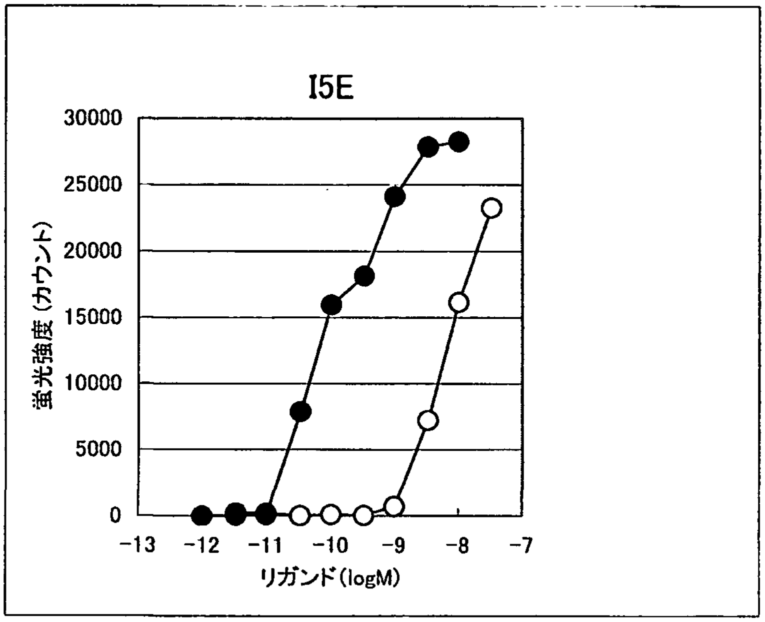

I5E
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
蛍光強度（カウント）
−13
−12
−11
−10
−9
−8
−7
リガンド(logM)

図１４

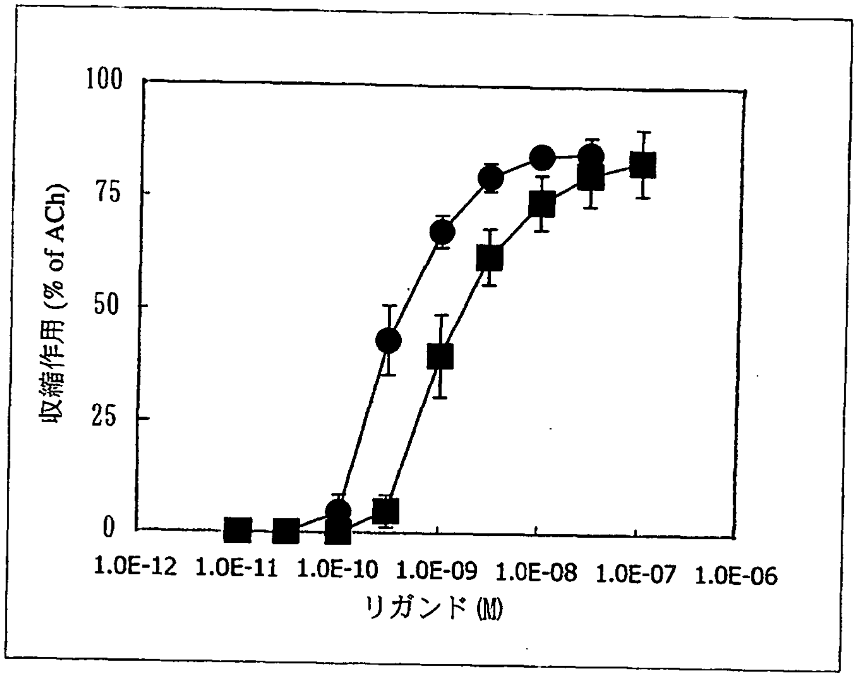

100
75
50
25
0
収縮作用 (% of ACh)
1.0E-12
1.0E-11
1.0E-10
1.0E-09
1.0E-08
1.0E-07
1.0E-06
リガンド (M)

図１５

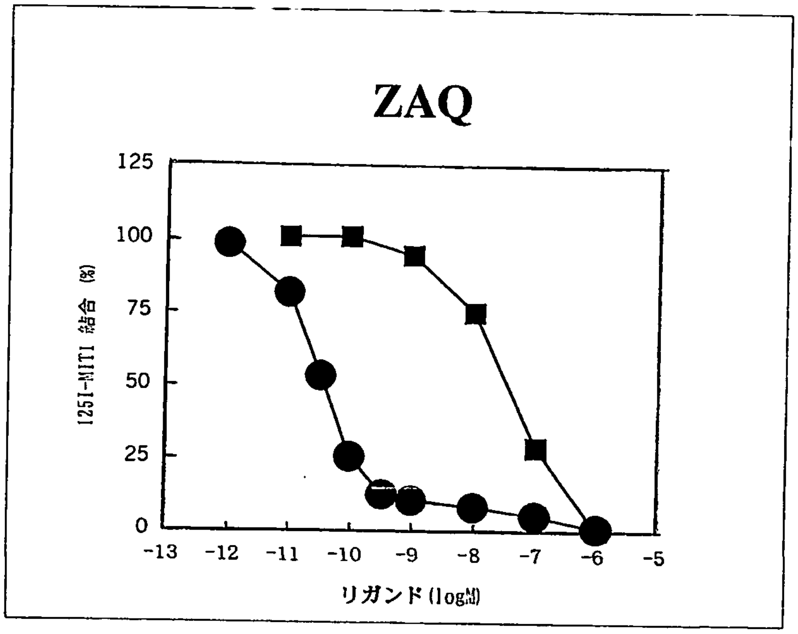
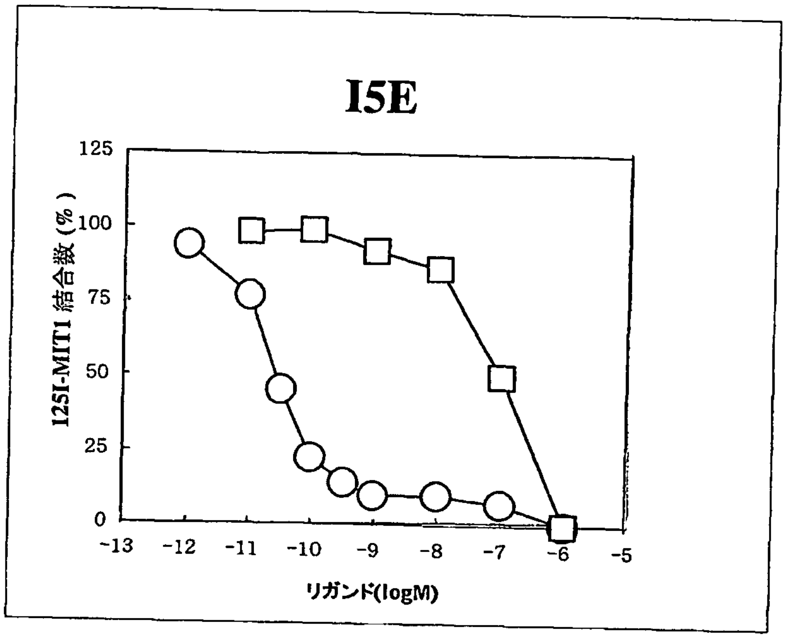


図１６



[SEQUENCE LISTING]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Phisiological Active Peptide and Its Use

<130> P2001-174PCT

<150> JP 2000-217442
<151> 2000-07-18
<150> JP 2001-26779
<151> 2001-02-02

<160> 58

<210> 1
<211> 393
<212> PRT
<213> Human

<400> 1
```
Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser
                 5                  10                  15
Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser
             20                  25                  30
Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu
         35                  40                  45
Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
     50                  55                  60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
 65                  70                  75                  80
Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
                 85                  90                  95
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
            100                 105                 110
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
```

```
        115                 120                 125
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg
    130                 135                 140
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
145                 150                 155                 160
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
                165                 170                 175
Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu
            180                 185                 190
Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
        195                 200                 205
Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
    210                 215                 220
Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu
225                 230                 235                 240
Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
            260                 265                 270
Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys
        275                 280                 285
Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
    290                 295                 300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305                 310                 315                 320
Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
                325                 330                 335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr
            340                 345                 350
Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly
        355                 360                 365
Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr
    370                 375                 380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
385                 390
```

〈210〉 2
〈211〉 1179
〈212〉 DNA
〈213〉 Human

〈400〉 2
atggagacca ccatggggtt catggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt 60
tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120
gactatgata tgcctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttctttgct 180
gccaagattg tcattgggat ggccctggtg ggcatcatgc tggtctgcgg cattggaaac 240
ttcatcttta tcgctgccct ggtccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300
atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc 420
aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catcgccatt 480
gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtgcca aacagccact 540
ggcctgattg ccttggtgtg gacggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600
accaccgaga cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
ttcgtgggcc ccgtggtcac catgaccctg tgctatgcca ggatctcccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840
aagacggtcc tggtgctcat gtgcatcctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt tcgtgaagga gaagcactac 960
ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcatc gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080
tggaaggctt cttacaatgg cggtaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcatc agactaaaa 1179

〈210〉 3
〈211〉 1179
〈212〉 DNA
〈213〉 Human

〈400〉 3
atggagacca ccatggggtt catggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt 60
tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120
gactatgata tgcctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttctttgct 180

gccaagattg tcattgggat ggccctggtg ggcatcatgc tggtctgcgg cattggaaac 240
ttcatcttta tcgctgccct ggtccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300
atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc 420
aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catcgccatt 480
gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtgcca aacagccact 540
ggcctgattg ccttggtgtg gacggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600
accaccgaga cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
ttcgtgggcc ccgtggtcac catgaccctg tgctatgcca ggatctcccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840
aagacggtcc tggtgctcat gtgcatcctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcatc gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080
tggaaggctt cttacaatgg cggtaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcatc agactaaaa 1179

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 4
gtcgacatgg agaccaccat ggggttcatg g 31

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 5
actagtttat tttagtctga tgcagtccac ctcttc 36

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 6
tcatgttgct ccactggaag g 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 7
ccaattgtct tgaggtccag g 21

<210> 8
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 8
ttcttacaat ggcggtaagt ccagtgcag 39

<210> 9
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 9
gtcgacatgg agaccaccat ggggttcatg g 31

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 10
actagtttat tttagtctga tgcagtccac ctcttc 36

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Bovine

<400> 11
Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly
5 10 15

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 12
ggtgccacgc gagtctcaat catgctcc 28

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 13
ggggcctgtg agcgggatgt ccagtgtg 28

<210> 14
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 14
cttcttcagg aaacgcaagc accacacc 28

<210> 15
<211> 409
<212> DNA
<213> Human

<400> 15
cttcttcagg aaacgcaagc accacacctg tccttgcttg cccaacctgc tgtgctccag 60

gttcccggac ggcaggtacc gctgctccat ggacttgaag aacatcaatt tttaggcgct 120
tgcctggtct caggataccc accatccttt tcctgagcac agcctggatt tttatttctg 180
ccatgaaacc cagctcccat gactctccca gtccctacac tgactaccct gatctctctt 240
gtctagtacg cacatatgca cacaggcaga catacctccc atcatgacat ggtccccagg 300
ctggcctgag gatgtcacag cttgaggctg tggtgtgaaa ggtggccagc ctggttctct 360
tccctgctca ggctgccaga gaggtggtaa atggcagaaa ggacattcc 409

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 16
ccaccatgag aggtgccacg 20

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 17
ctcgagctca ggaaaaggat ggtg 24

<210> 18
<211> 371
<212> DNA
<213> Human

<400> 18
ccaccatgag aggtgccacg cgagtctcaa tcatgctcct cctagtaact gtgtctgact 60

```
gtgctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120
ccatcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180
agtgccaccc cggcagccac aagatcccct tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240
cttgcttgcc caacctgctg tgctccaggt tcccggacgg caggtaccgc tgctccatgg 300
acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctggtctca ggatacccac catccttttc 360
ctgagctcga g                                                      371

<210> 19
<211> 371
<212> DNA
<213> Human

<400> 19
ccaccatgag aggtgccacg cgagtctcaa tcatgctcct cctagtaact gtgtctgact  60
gtgctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120
ccatcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180
agtgccaccc cggcagccac aaggtcccct tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240
cttgcttgcc caacctgctg tgctccaggt tcccggacgg caggtaccgc tgctccatgg 300
acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctggtctca ggatacccac catccttttc 360
ctgagctcga g                                                      371

<210> 20
<211> 86
<212> PRT
<213> Human

<400> 20
Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
                5                   10                  15
Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
            20                  25                  30
Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Ile
        35                  40                  45
Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
    50                  55                  60
Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
```

65 70 75 80
Leu Lys Asn Ile Asn Phe
85

<210> 21
<211> 86
<212> PRT
<213> Human

<400> 21
Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly
5 10 15
Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
20 25 30
Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val
35 40 45
Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn
50 55 60
Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp
65 70 75 80
Leu Lys Asn Ile Asn Phe
85

<210> 22
<211> 105
<212> PRT
<213> Human

<400> 22
Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
5 10 15
Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
20 25 30
Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
35 40 45
Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser

50 55 60
His Lys Ile Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
65 70 75 80
Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
85 90 95
Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
100 105

<210> 23
<211> 105
<212> PRT
<213> Human

<400> 23
Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
5 10 15
Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
20 25 30
Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
35 40 45
Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
50 55 60
His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
65 70 75 80
Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
85 90 95
Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe
100 105

<210> 24
<211> 678
<212> DNA
<213> Human

<400> 24
aaggctgagc gggaggaagc gagaggcatc taagcaggca gtgttttgcc ttcaccccaa 60

gtgaccatga gaggtgccac gcgagtctca atcatgctcc tcctagtaac tgtgtctgac 120
tgtgctgtga tcacaggggc ctgtgagcgg gatgtccagt gtggggcagg cacctgctgt 180
gccatcagcc tgtggcttcg agggctgcgg atgtgcaccc cgctggggcg ggaaggcgag 240
gagtgccacc ccggcagcca caagatcccc ttcttcagga aacgcaagca ccacacctgt 300
ccttgcttgc ccaacctgct gtgctccagg ttcccggacg gcaggtaccg ctgctccatg 360
gacttgaaga acatcaattt ttaggcgctt gcctggtctc aggataccca ccatcctttt 420
cctgagcaca gcctggattt ttatttctgc catgaaaccc agctcccatg actctcccag 480
tccctacact gactaccctg atctctcttg tctagtacgc acatatgcac acaggcagac 540
atacctccca tcatgacatg gtccccaggc tggcctgagg atgtcacagc ttgaggctgt 600
ggtgtgaaag gtggccagcc tggttctctt ccctgctcag gctgccagag aggtggtaaa 660
tggcagaaag gacattcc 678

<210> 25
<211> 678
<212> DNA
<213> Human

<400> 25
aaggctgagc gggaggaagc gagaggcatc taagcaggca gtgttttgcc ttcaccccaa 60
gtgaccatga gaggtgccac gcgagtctca atcatgctcc tcctagtaac tgtgtctgac 120
tgtgctgtga tcacaggggc ctgtgagcgg gatgtccagt gtggggcagg cacctgctgt 180
gccatcagcc tgtggcttcg agggctgcgg atgtgcaccc cgctggggcg ggaaggcgag 240
gagtgccacc ccggcagcca caaggtcccc ttcttcagga aacgcaagca ccacacctgt 300
ccttgcttgc ccaacctgct gtgctccagg ttcccggacg gcaggtaccg ctgctccatg 360
gacttgaaga acatcaattt ttaggcgctt gcctggtctc aggataccca ccatcctttt 420
cctgagcaca gcctggattt ttatttctgc catgaaaccc agctcccatg actctcccag 480
tccctacact gactaccctg atctctcttg tctagtacgc acatatgcac acaggcagac 540
atacctccca tcatgacatg gtccccaggc tggcctgagg atgtcacagc ttgaggctgt 600
ggtgtgaaag gtggccagcc tggttctctt ccctgctcag gctgccagag aggtggtaaa 660
tggcagaaag gacattcc 678

<210> 26
<211> 258
<212> DNA
<213> Human
<400> 26

gctgtgatca caggggcctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60
atcagcctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccgc tggggcggga aggcgaggag 120
tgccaccccg gcagccacaa gatccccttc ttcaggaaac gcaagcacca cacctgtcct 180
tgcttgccca acctgctgtg ctccaggttc ccggacggca ggtaccgctg ctccatggac 240
ttgaagaaca tcaatttt 258

<210> 27
<211> 258
<212> DNA
<213> Human

<400> 27
gctgtgatca caggggcctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60
atcagcctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccgc tggggcggga aggcgaggag 120
tgccaccccg gcagccacaa ggtccccttc ttcaggaaac gcaagcacca cacctgtcct 180
tgcttgccca acctgctgtg ctccaggttc ccggacggca ggtaccgctg ctccatggac 240
ttgaagaaca tcaatttt 258

<210> 28
<211> 315
<212> DNA
<213> Human

<400> 28
atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctcctcctag taactgtgtc tgactgtgct 60
gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120
agcctgtggc ttcgagggct gcggatgtgc accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180
caccccggca gccacaagat ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240
ttgcccaacc tgctgtgctc caggttcccg gacggcaggt accgctgctc catggacttg 300
aagaacatca atttt 315

<210> 29
<211> 315
<212> DNA
<213> Human

<400> 29
atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctcctcctag taactgtgtc tgactgtgct 60
gtgatcacag ggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120
agcctgtggc ttcgagggct gcggatgtgc accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180
caccccggca gccacaaggt ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240
ttgcccaacc tgctgtgctc caggttcccg gacggcaggt accgctgctc catggacttg 300
aagaacatca atttt 315

<210> 30
<211> 382
<212> DNA
<213> Human

<400> 30
gaattcgccc ttccaccatg agaggtgcca cgcgagtctc aatcatgctc ctcctagtaa 60
ctgtgtctga ctgtgctgtg atcacagggg cctgtgagcg ggatgtccag tgtggggcag 120
gcacctgctg tgccatcagc ctgtggcttc gagggctgcg gatgtgcacc ccgctggggc 180
gggaaggcga ggagtgccac cccggcagcc acaaggtccc cttcttcagg aaacgcaagc 240
accacacctg tccttgcttg cccaacctgc tgtgctccag gttcccggac ggcaggtacc 300
gctgctccat ggacttgaag aacatcaatt tttaggcgct tgcctggtct caggataccc 360
accatccttt cctgagctcg ag 382

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 31
Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp
5 10

<210> 32
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 32
gtcgaccacc atgagaggtg ccacgc 26

<210> 33
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 33
actagtcgca gaactggtag gtatgg 26

<210> 34
<211> 80
<212> PRT
<213> Dendroaspis polylepis

<400> 34
```
Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Leu Gln Cys Gly Lys Gly
                5                   10                  15
Thr Cys Cys Ala Val Ser Leu Trp Ile Lys Ser Val Arg Val Cys Thr
            20                  25                  30
Pro Val Gly Thr Ser Gly Glu Asp Cys His Pro Ala Ser His Lys Ile
        35                  40                  45
Pro Phe Ser Gly Gln Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Ala Pro Asn
    50                  55                  60
Leu Ala Cys Val Gln Thr Ser Pro Lys Lys Phe Lys Cys Leu Ser Lys
65                  70                  75                  80
```

<210> 35
<211> 1152

<212> DNA
<213> Human

<400> 35
atggcagccc agaatggaaa caccagtttc acacccaact ttaatccacc ccaagaccat 60
gcctcctccc tctcctttaa cttcagttat ggtgattatg acctccctat ggatgaggat 120
gaggacatga ccaagacccg gaccttcttc gcagccaaga tcgtcattgg cattgcactg 180
gcaggcatca tgctggtctg cggcatcggt aactttgtct ttatcgctgc cctcacccgc 240
tataagaagt tgcgcaacct caccaatctg ctcattgcca acctggccat ctccgacttc 300
ctggtggcca tcatctgctg ccccttcgag atggactact acgtggtacg gcagctctcc 360
tgggagcatg gccacgtgct ctgtgcctcc gtcaactacc tgcgcaccgt ctccctctac 420
gtctccacca atgccttgct ggccattgcc attgacagat atctcgccat cgttcacccc 480
ttgaaaccac ggatgaatta tcaaacggcc tccttcctga tcgccttggt ctggatggtg 540
tccattctca ttgccatccc atcggcttac tttgcaacag aaaccgtcct ctttattgtc 600
aagagccagg agaagatctt ctgtggccag atctggcctg tggatcagca gctctactac 660
aagtcctact tcctcttcat ctttggtgtc gagttcgtgg gccctgtggt caccatgacc 720
ctgtgctatg ccaggatctc ccgggagctc tggttcaagg cagtccctgg gttccagacg 780
gagcagattc gcaagcggct gcgctgccgc aggaagacgg tcctggtgct catgtgcatt 840
ctcacggcct atgtgctgtg ctgggcaccc ttctacggtt tcaccatcgt tcgtgacttc 900
ttccccactg tgttcgtgaa ggaaaagcac tacctcactg ccttctacgt ggtcgagtgc 960
atcgccatga gcaacagcat gatcaacacc gtgtgcttcg tgacggtcaa gaacaacacc 1020
atgaagtact tcaagaagat gatgctgctg cactggcgtc cctcccagcg ggggagcaag 1080
tccagtgctg accttgacct cagaaccaac ggggtgccca ccacagaaga agtggactgt 1140
atcaggctga ag 1152

<210> 36
<211> 384
<212> PRT
<213> Human

<400> 36
Met Ala Ala Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro
5 10 15
Pro Gln Asp His Ala Ser Ser Leu Ser Phe Asn Phe Ser Tyr Gly Asp
20 25 30
Tyr Asp Leu Pro Met Asp Glu Asp Glu Asp Met Thr Lys Thr Arg Thr

```
         35                  40                  45
Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Ile Ala Leu Ala Gly Ile Met
     50                  55                  60
Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Thr Arg
 65                  70                  75                  80
Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala
                 85                  90                  95
Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Ile Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp
            100                 105                 110
Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys
        115                 120                 125
Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn
    130                 135                 140
Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro
145                 150                 155                 160
Leu Lys Pro Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu
                165                 170                 175
Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Ala
            180                 185                 190
Thr Glu Thr Val Leu Phe Ile Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys
        195                 200                 205
Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe
    210                 215                 220
Leu Phe Ile Phe Gly Val Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr
225                 230                 235                 240
Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro
                245                 250                 255
Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys
            260                 265                 270
Thr Val Leu Val Leu Met Cys Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp
        275                 280                 285
Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val
    290                 295                 300
Phe Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys
305                 310                 315                 320
Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Val Cys Phe Val Thr Val
```

325 330 335
Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Met Leu Leu His Trp
340 345 350
Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg
355 360 365
Thr Asn Gly Val Pro Thr Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
370 375 380 384

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 37
gtcgacatgg agaccactgt ggggaccctg 30

<210> 38
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 38
actagtttat ttcagtcgga tgcagtccac 30

<210> 39
<211> 1179
<212> DNA
<213> Rat

<400> 39

atggagacca ctgtggggac cctgggcgag aataccacaa acactttcac cgacttcttt 60
tctgcacgtg atggcagtgg agccgaaacc tccccttgc cattcacttt cagctatggt 120
gactatgaca tgccctcgga tgaagaggag gatgtgacca actctcggac tttctttgct 180
gccaagattg tcattggcat ggctttggtg ggcatcatgc tggtgtgtgg catcggcaac 240
ttcatcttca tcactgcgct ggcccgctac aaaaagcttc gcaacctcac caacctgctt 300
atcgccaacc tggccatttc ggacttcctg gtagccatcg tgtgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggtacgcca gctctcctgg gagcacggcc atgtcctgtg cgcctccgtc 420
aactacttgc gcaccgtctc cctctacgtg tccactaacg ccctactggc cattgccatt 480
gacaggtatc tggccattgt gcacccgctg agaccgcgga tgaagtgtca aacggctgca 540
ggcctgatct tcctggtgtg gtctgtgtcc atcctcatcg ccatcccagc cgcctacttc 600
accactgaga cggtgttggt catcgtggaa agccaggaga agatcttctg cggccagatc 660
tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttttggtctt cggcctcgag 720
ttcgtgggtc ctgtaatcgc catgaccctg tgctatgcca gggtgtcccg agagctctgg 780
ttcaaggcgg tgcccggctt ccagacagag cagatccgcc ggaggctgcg ctgtcgccga 840
cggacggtac tggggctcgt gtgcgtcctt tccgcctatg tgctgtgctg ggctcccttc 900
tatggcttca ccatcgtgcg tgacttcttc ccctccgtgt ttgtgaaaga gaagcactac 960
ctcaccgcct tttatgtggt ggagtgcatc gccatgagca acagtatgat caatacgctg 1020
tgctttgtga ctgtcaggaa taacaccagt aagtacctca agaggatcct gcggctccag 1080
tggagggcct ctcctagcgg gagcaaggcc agcgctgacc tcgacctcag gaccacgggg 1140
attcctgcca cggaggaggt ggactgcatc cgactgaaa 1179

〈210〉 40
〈211〉 393
〈212〉 PRT
〈213〉 Rat

〈400〉 40
Met Glu Thr Thr Val Gly Thr Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asn Thr Phe
5 10 15
Thr Asp Phe Phe Ser Ala Arg Asp Gly Ser Gly Ala Glu Thr Ser Pro
20 25 30
Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Ser Asp Glu
35 40 45
Glu Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
50 55 60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn

```
 65                  70                  75                  80
Phe Ile Phe Ile Thr Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
                 85                  90                  95
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
            100                 105                 110
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
        115                 120                 125
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg
    130                 135                 140
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
145                 150                 155                 160
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
                165                 170                 175
Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu
            180                 185                 190
Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
        195                 200                 205
Val Glu Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
    210                 215                 220
Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu
225                 230                 235                 240
Phe Val Gly Pro Val Ile Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser
                245                 250                 255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
            260                 265                 270
Arg Arg Arg Leu Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys
        275                 280                 285
Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
    290                 295                 300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305                 310                 315                 320
Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
                325                 330                 335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr
            340                 345                 350
Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser
```

```
        355                 360                 365
Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr
    370                 375                 380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
385                 390
```

<210> 41
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 41
cctcaccaay ctgctyatyg ccaacctggc c   31

<210> 42
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 42
gtggtrcgsc agctctcctg ggagca   26

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 43
tcccgggagc tctggttcaa ggc 23

<210> 44
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 44
gagtgcatcg ccatgagcaa cagcatg 27

<210> 45
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 45
ggcttgaacc agagctcccg gga 23

<210> 46
<211> 1266
<212> DNA
<213> Rat

<400> 46
atggtatcag ttctgtccaa cagggacctc cacacactgg ccccagctga agtgctgaac 60
tccacgtggg cctatctccc tgacacatac cagcctacct gccacatcat caacatggga 120
gaccagaacg gaaacacaag ctttgcacca gacttgaacc caccccaaga ccacgtctcc 180
ttgctcccct taaactacag ttatggagat tatgacatcc ccctggatga cgatgaggat 240
gtgaccaaga cacagacctt ctttgcagcc aaaatcgtca ttggcgtagc cctggcaggc 300

```
atcatgctag tctgcggcgt tggcaacttt gtcttcattg ctgccctcgc ccgctacaag  360
aagctgcgca accttaccaa cctcctcatc gctaacctgg ccatctctga cttcctggtg  420
gcgatcgtct gctgcccctt tgagatggac tactacgtag tacgtcagct ttcctgggag  480
catggtcacg tgctttgtgc ctccgtcaac taccttcgta cagtctccct gtacgtctcc  540
accaatgctc tgctggccat cgctattgac agatatctcg ctattgtcca cccccttaaaa 600
cggatgaatt accagaccgc ctccttcctg atcgctttgg tctggatggt ctccatcctc  660
atcgccatcc catctgccta cttcaccaca gaaaccatcc ttgttatcgt caagaatcag  720
gaaaagctct tctgtggtca gatctggccc gtggaccagc agctctacta caaatcctac  780
ttcctcttcg tcttcgggct tgagttcgtg ggtcccgtgg tcactatgac cctgtgctat  840
gccaggatct cccaggagct ctggttcaag gctgtacctg gtttccagac ggagcagatc  900
cgcaagcgac tgcgctgccg ccgaaagaca gtgctattgc tcatgggtat cctcacagcc  960
tacgtgctgt gctgggcgcc tttctatggc tttaccatag tgcgagactt cttccccacg 1020
ctggttgtga aggagaagca ctacctcacc gccttctatg tcgtcgagtg catcgccatg 1080
agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacggtca agaacaacac catgaaatac 1140
ttcaagaaga tgctgctgct gcactggcgg ccctctcact acgggagtaa gtccagcgcg 1200
gacctcgacc tcaaaaccag tggggttcct gccaccgaag aggtggactg tatcaggcta 1260
aagtag                                                            1266
```

〈210〉 47
〈211〉 421
〈212〉 PRT
〈213〉 Rat

〈400〉 47

```
Met Val Ser Val Leu Ser Asn Arg Asp Leu His Thr Leu Ala Pro Ala
                5                   10                  15
Glu Val Leu Asn Ser Thr Trp Ala Tyr Leu Pro Asp Thr Tyr Gln Pro
            20                  25                  30
Thr Cys His Ile Ile Asn Met Gly Asp Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe
        35                  40                  45
Ala Pro Asp Leu Asn Pro Pro Gln Asp His Val Ser Leu Leu Pro Leu
    50                  55                  60
Asn Tyr Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Ile Pro Leu Asp Asp Asp Glu Asp
65                  70                  75                  80
Val Thr Lys Thr Gln Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Val
                85                  90                  95
```

```
Ala Leu Ala Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Val Gly Asn Phe Val Phe
            100                 105                 110
Ile Ala Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu
        115                 120                 125
Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Val Cys
    130                 135                 140
Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu
145                 150                 155                 160
His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser
                165                 170                 175
Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr
            180                 185                 190
Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser
        195                 200                 205
Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro
    210                 215                 220
Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln
225                 230                 235                 240
Glu Lys Leu Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr
                245                 250                 255
Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro
            260                 265                 270
Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp
        275                 280                 285
Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu
    290                 295                 300
Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala
305                 310                 315                 320
Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp
                325                 330                 335
Phe Phe Pro Thr Leu Val Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe
            340                 345                 350
Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile
        355                 360                 365
Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met
    370                 375                 380
```

Leu Leu Leu His Trp Arg Pro Ser His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala
385 390 395 400
Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp
405 410 415
Cys Ile Arg Leu Lys
420

<210> 48
<211> 393
<212> PRT
<213> Mouse

<400> 48
Met Glu Thr Thr Val Gly Ala Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asp Thr Phe
1 5 10 15
Thr Asp Phe Phe Ser Ala Leu Asp Gly His Glu Ala Gln Thr Gly Ser
20 25 30
Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu
35 40 45
Glu Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
50 55 60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
65 70 75 80
Phe Ile Phe Ile Thr Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
85 90 95
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
100 105 110
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
115 120 125
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg
130 135 140
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
145 150 155 160
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
165 170 175
Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu

180 185 190

Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile

195 200 205

Val Glu Arg Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp

210 215 220

Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu

225 230 235 240

Phe Val Gly Pro Val Val Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser

245 250 255

Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile

260 265 270

Arg Arg Thr Val Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys

275 280 285

Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr

290 295 300

Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr

305 310 315 320

Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met

325 330 335

Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr

340 345 350

Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser

355 360 365

Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr

370 375 380

Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys

385 390 393

<210> 49
<211> 381
<212> PRT
<213> Mouse

<400> 49

Met Gly Pro Gln Asn Arg Asn Thr Ser Phe Ala Pro Asp Leu Asn Pro

1 5 10 15

Pro Gln Asp His Val Ser Leu Asn Tyr Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Leu

20 25 30

Pro Leu Gly Glu Asp Glu Asp Val Thr Lys Thr Gln Thr Phe Phe Ala

35 40 45

Ala Lys Ile Val Ile Gly Val Ala Leu Ala Gly Ile Met Leu Val Cys

50 55 60

Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys

65 70 75 80

Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp

85 90 95

Phe Leu Val Ala Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val

100 105 110

Val Arg Gln Leu Ser Trp Ala His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val

115 120 125

Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu

130 135 140

Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Pro

145 150 155 160

Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met

165 170 175

Val Ser Ile Leu Ile Ala Val Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr

180 185 190

Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile

195 200 205

Trp Ser Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val

210 215 220

Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr

225 230 235 240

Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln

245 250 255

Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu

260 265 270

Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe

275 280 285

Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Val Val Lys

290 295 300

Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met
305 310 315 320
Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn
325 330 335
Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Leu Arg Leu His Trp Arg Pro Ser
340 345 350
His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly
355 360 365
Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
370 375 380

<210> 50
<211> 1179
<212> DNA
<213> Mouse

<400> 50
atggagacca ctgtcggggc tctgggtgag aataccacag acaccttcac cgacttcttt 60
tctgcactcg atggccatga agcccaaacc ggctcgttac cattcacttt cagctacggt 120
gactatgaca tgcccctgga tgaagaggaa gatgtgacca attctcggac tttctttgct 180
gccaagattg tcattggcat ggctttggtg ggtatcatgc tagtgtgtgg catcggcaac 240
ttcatcttta tcactgccct ggcccgctac aaaaagctcc gcaacctcac caacctgctt 300
atcgccaacc tggccatttc agacttcctc gtggccatcg tgtgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggtgcgcca gctctcctgg gagcatggtc atgtcctgtg cgcctctgtc 420
aactacttgc gtaccgtctc cctctacgtc tccactaacg ccctactggc cattgccatt 480
gacaggtatc tggccattgt gcacccgctg agaccgcgga tgaagtgtca aacagccgcc 540
ggcctgatct tcctggtgtg gtcagtatcc atcctcatcg ccattccagc tgcctacttc 600
accactgaga ccgtgctggt catcgtggag agacaggaga agatcttctg tggtcagatc 660
tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttttggtttt cggcctcgag 720
ttcgtgggcc ccgtagtcgc catgaccttg tgctatgcca gggtgtcccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tgccaggctt ccagacagag cagatccgcc ggacggtgcg ctgccgccgc 840
aggacggtgc tggggctcgt gtgcgtcctc tctgcctatg tgctgtgctg ggctcccttc 900
tatggcttca ctatcgtgcg tgacttcttc ccctccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcaccgcct tctatgtggt ggagtgcatc gccatgagca acagcatgat caatacgctc 1020
tgctttgtga ctgtcaggaa taacaccagt aagtacctca agaggatcct gcggcttcag 1080
tggagggcct ctcccagcgg gagcaaggcc agcgctgacc tcgacctcag gaccacggga 1140

atacctgcca ccgaggaggt ggactgcatc cgactgaaa 1179

<210> 51
<211> 1143
<212> DNA
<213> Mouse

<400> 51
atgggacccc agaacagaaa cactagcttt gcaccagact tgaatccacc ccaagaccat 60
gtctccttaa actacagtta tggtgattat gacctccccc tgggtgagga tgaggatgtg 120
accaagacac agaccttctt tgcagccaaa attgtcattg gcgtggcact ggcaggcatc 180
atgctggtct gcggcattgg caactttgtc ttcattgctg ccctcgcccg ctacaagaag 240
ctgcgcaacc ttaccaacct cctcattgct aacctggcca tctctgactt cctggtggcg 300
atcgtctgct gccccttga gatggactat tatgtagtac ggcagctttc ctgggcgcat 360
ggtcacgtgc tttgtgcctc cgtcaactac cttcgtacgg tctccctgta cgtctccacc 420
aacgctctgc tggccatcgc tattgacaga tacctcgcta ttgtccaccc tttgaaacca 480
cggatgaatt atcagaccgc ttccttcctg atcgctttgg tctggatggt ctccatcctc 540
atcgctgtcc catctgccta cttcaccaca gaaaccatcc tcgttatcgt caagaatcaa 600
gaaaaaatct tctgtggtca gatctggtcg gtggaccagc agctctacta caaatcctac 660
ttcctcttcg tcttcgggct tgagttcgtg ggtcccgtgg tcactatgac cctgtgctat 720
gccaggatct cccaagagct ctggttcaag gctgtacctg gcttccagac ggagcaaatc 780
cgcaagcggc tgcgttgccg ccgcaagaca gtgctactgc tcatgggcat cctcacagcc 840
tacgtgctgt gctgggcgcc gttctatggc tttaccatag tgcgagactt cttccccacg 900
gtagttgtga aggagaagca ctacctcacc gccttctacg tcgtggagtg cattgccatg 960
agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacggtca agaacaacac catgaaatac 1020
ttcaagaaga tgctgcggct ccactggcgg ccctctcact acgggagtaa gtccagcgct 1080
gacctcgacc tcaaaaccag cggggtgcct gccactgaag aggtggattg tatcagacta 1140
aag 1143

<210> 52
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 52
tatggcggtg attaccggtg cgtgcgaacg tgatgtgcag tgcggtgcgg gtacctgctg 60
cgcgattagc ctgtggctgc gtggtctg 88

<210> 53
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 53
cgtatgtgca ccccgctggg tcgtgaaggt gaagaatgcc atccgggtag ccataaagtg 60
ccgttcttcc gtaaacgtaa acatcatacc tg 92

<210> 54
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 54
cccgtgcctg ccgaacctgc tgtgcagccg tttcccggat ggtcgttatc gttgcagcat 60
ggatctgaaa aacattaact tttagg 86

<210> 55
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 55
cacatacgca gaccacgcag ccacaggcta atcgcgcagc aggtacccgc accgcactgc 60
acatcacgtt cgcacgcacc ggtaatcacc gcca 94

<210> 56
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 56
aggcacgggc aggtatgatg tttacgttta cggaagaacg gcactttatg gctacccgga 60
tggcattctt caccttcacg acccagcggg gtg 93

<210> 57
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 57
gatccctaaa agttaatgtt tttcagatcc atgctgcaac gataacgacc atccgggaaa 60
cggctgcaca gcaggttcgg c 81

<210> 58
<211> 258
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223>

<400> 58
gcggtgatta ccggtgcgtg cgaacgtgat gtgcagtgcg gtgcgggtac ctgctgcgcg 60
attagcctgt ggctgcgtgg tctgcgtatg tgcaccccgc tgggtcgtga aggtgaagaa 120
tgccatccgg gtagccataa agtgccgttc ttccgtaaac gtaaacatca tacctgcccg 180
tgcctgccga acctgctgtg cagccgtttc ccggatggtc gttatcgttg cagcatggat 240
ctgaaaaaca ttaacttt 258

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/06162

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl^7 C12N 15/12, 1/21, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/68,
A61K 38/00, 45/00, 48/00, A61P 1/00, 3/00, 9/00, 25/28, 29/00, 35/00, 37/00, G01N
33/15, 33/50, 33/53, 33/566 // (C12N 1/21, C12R 1:19)(C12P 21/02, C12R 1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl^7 C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 01/16309 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 08 March, 2001 (08.03.01), & AU 200067280 A	1-17,22-23
P,X	WO 01/36465 A2 (Zymogenetics, Inc.), 25 May, 2001 (25.05.01), & AU 200116082 A	1-17,22-23
P,X	WO 00/75327 A1 (Genentech, Inc.), 14 December, 2000 (14.12.00), & AU 200032461 A	1-17,22-23
P,X	WO 00/73454 A1 (Genentech, Inc.), 07 December, 2000 (07.12.00), & AU 200037743 A	1-17,22-23
P,X	WO 00/70049 A2 (Incyte Genomics, Inc.), 23 November, 2000 (23.11.00), & AU 200051511 A	1-17,22-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 27 September, 2001 (27.09.01)	Date of mailing of the international search report 16 October, 2001 (16.10.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00/53753 A2 (Genentech, Inc.), 14 September, 2000 (14.09.00), & AU 200026008 A	1-17,22-23
P,X	WO 00/52022 A1 (Millennium Pharmaceuticals, Inc.), 08 September, 2000 (08.09.00), & AU 200033868 A	1-17,22-23
X	WO 99/63088 A2 (Genentech, Inc.), 09 December, 1999 (09.12.99), & AU 9943286 A	1-17,22-23
X	WO 00/34334 A1 (Synaptic Pharmaceutical Corporation), 15 June, 2000 (15.06.00), & AU 200021723 A	1-17,22-23
X	WO 98/46620 A1 (Millennium Pharmaceuticals, Inc.), 22 October, 1998 (22.10.98), & AU 9869736 A & US 5891720 A & EP 1007536 A1	1-17,22-23
A	FUJII R. et al., "Identification of Neuromedin U as the Cognate Ligand of the Orphan G Protein-coupled Receptor FM-3", J. Biol. Chem., 14 July, 2000, Vol.275, No.28, pages 21068 to 21074	1-17,22-23
A	OSINSKI M. A. et al., "Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract", Eur. J. Pharmacal., (1999), Vol.365, No.2-3, pages 281 to 289	1-17,22-23
A	TATEMOTO K. et al., "Isolation and Characterization of a Novel Endogenous PeptideLigand for the Human APJ Receptor", Biochem. Biophys. Res. Commun., (1998), Vol.251, No.2, pages 471 to 476	1-17,22-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/06162

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 24-25
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
These claims involve methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☒ Claims Nos.: 18-21,26-27
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

Concerning Column I-2.

A compound or its salt capable of altering the binding properties of the peptide or its salt as set forth in claim 18 to a protein or its salt having an amino acid which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 is specified by using the screening method as set forth in claim 14 or the screening kit as set forth in claim 16. Namely, any compounds obtained by the screening method and the screening kit are involved in the scope thereof.

However, the description discloses no particular compound obtained by the screening method and the screening kit. Thus claim 18 is neither supported nor disclosed in the description. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what particular compounds are involved in the scope and what are not. Thus, the above claim is described in an extremely unclear manner.

Therefore, no meaningful search can be practiced on the invention as set forth in the above claim.

The same applies to claims 19 to 21, 26 and 27.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０１／０６１６２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int. Cl^7　C12N 15/12, 1/21, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/68,
A61K 38/00, 45/00, 48/00, A61P 1/00, 3/00, 9/00, 25/28, 29/00, 35/00, 37/00, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566
//(C12N 1/21, C12R 1:19)(C12P 21/02, C12R 1:19)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int. Cl^7　C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 01/16309 A1（武田薬品工業株式会社） 8.3月.2001(08.03.01) & AU 200067280 A	1-17, 22-23
P, X	WO 01/36465 A2（ZYMOGENETICS, INC.） 25.5月.2001(25.05.01) & AU 200116082 A	1-17, 22-23

☒　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　□　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２７．０９．０１	国際調査報告の発送日 **16.10.01**
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　２９３７ 本間　夏子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

C（続き）．関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P,X	WO 00/75327 A1 (GENENTECH, INC.) 14.12月.2000(14.12.00) & AU 200032461 A	1-17, 22-23
P,X	WO 00/73454 A1 (GENENTECH, INC.) 7.12月.2000(07.12.00) & AU 200037743 A	1-17, 22-23
P,X	WO 00/70049 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 23.11月.2000(23.11.00) & AU 200051511 A	1-17, 22-23
P,X	WO 00/53753 A2 (GENENTECH, INC.) 14.9月.2000(14.09.00) & AU 200026008 A	1-17, 22-23
P,X	WO 00/52022 A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 8.9月.2000(08.09.00) & AU 200033868 A	1-17, 22-23
X	WO 99/63088 A2 (GENENTECH, INC.) 9.12月.1999(09.12.99) & AU 9943286 A	1-17, 22-23
X	WO 00/34334 A1 (SYNAPTIC PHARMACEUTICAL CORPORATION) 15.6月.2000(15.06.00) & AU 200021723 A	1-17, 22-23
X	WO 98/46620 A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 22.10月.1998(22.10.98) & AU 9869736 A & US 5891720 A & EP 1007536 A1	1-17, 22-23
A	FUJII R. et al. Identification of Neuromedin U as the Cognate Ligand of the Orphan G Protein-coupled Receptor FM-3. J. Biol. Chem. Jul. 14, 2000, Vol. 275, No. 28,, p. 21068-21074	1-17, 22-23
A	OSINSKI M. A. et al. Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract. Eur. J. Pharmacal. 1999, Vol. 365, No. 2-3, p. 281-289	1-17, 22-23

Ｃ（続き）．関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TATEMOTO K. et al. Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998, Vol. 251, No. 2, p. 471-476	1-17, 22-23

第Ｉ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲　２４－２５　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
   ヒトの治療方法を含むものである。

2. ☒ 請求の範囲　18-21, 26-27　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
   別紙（特別ページ）参照。

3. □ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第II欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. □ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. □ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. □ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. □ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
- □ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- □ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ｉ欄２．について

請求の範囲１８に記載の、請求項１に記載のペプチドまたはその塩と、配列番号１で表されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸を含有するタンパク質又はその塩との結合性を変化させる化合物又はその塩は、請求の範囲１４に記載のスクリーニング方法又は請求の範囲１６に記載のスクリーニング用キットを用いることによって特定されており、当該スクリーニング方法及びスクリーニング用キットによって得られるあらゆる化合物を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該スクリーニング方法及びスクリーニング用キットで得られる化合物としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲１８は明細書による裏付けを欠いており、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。

したがって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

請求の範囲１９－２１，２６－２７についても同様である。

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☑ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: ______________________________

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.